

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.445>

<https://orcid.org/0000-0003-3244-4979>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Greta Jarockytė

Teranostinių nanodalelių taikymo onkologinių ligų diagnostikoje ir terapijoje tyrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biofizika (N 011)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2022 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute.

Eksperimentiniai darbai atlikti Nacionaliniame vėžio institute, Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba pagal Europos Sąjungos struktūrinių fondų lėšų projektą Nr. 09.3.3-ESFA-V-711-01-0001 „Doktorantūros studijų plėtra“. Taip pat iš Lietuvos mokslo tarybos buvo gautos stipendijos už doktorantūros studijų rezultatus 2019 ir 2020 metais.

Tyrimus rėmė ir Nacionalinio vėžio instituto Mokslo fondas.

Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Daumantas Matulis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Nariai:

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011),

dr. Agata Mlynska (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. dr. Almira Ramanavičienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, chemija – N 003),

dr. Vladimir Sivakov (Leibnico Fotoninių technologijų institutas, gamtos mokslai, chemija – N 003).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. kovo mėn. 15 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje ir/arba nuotoliniu būdu.

Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva.

Tel. +37052234420; el. paštas: info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.445>

<https://orcid.org/0000-0003-3244-4979>

VILNIUS UNIVERSITY

Greta Jarockytė

Theranostic nanoparticles application for cancer diagnostics and treatment

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biophysics (N 011)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2022 at Vilnius University Life Sciences Centre Institute of Biosciences.

Experimental work was carried out at the National Cancer Institute, Biomedical Physics Laboratory.

The research was supported by Research Council of Lithuania under European Union Structural Funds project no. 09.3.3-ESFA-V-711-01-0001 “Development of doctoral studies”. Also, scholarships from Research Council of Lithuania were granted for academic achievements in 2019 and 2020.

Additionally, Scientific fund of National Cancer Institute supported the research.

Academic supervisor –

prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011)

This doctoral dissertation will be defended in a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – prof. dr. Daumantas Matulis (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

Members:

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011),

dr. Agata Mlynska (National Cancer Institute, Natural sciences, Biochemistry – N 004),

prof. dr. Almira Ramanavičienė (State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Natural sciences, Chemistry, N 003),

dr. Vladimir Sivakov (Leibniz Institute of Photonic Technology, Natural sciences, Chemistry, N 003).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 h on 15th March 2023 in the meeting room R-401 of Vilnius University Life Sciences Centre.

Address: Sauletekio ave. 7, LT-10527, Vilnius, Lithuania

Tel. +37052234420; e-mail: info@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

$^1\text{O}_2$ – singuletinis deguonis;
3D – trimatis (-ė);
5-ALA – 5-aminolevulino rūgštis;
AKND – apkonvertuojanti nanodalelė (*angl. upconverting nanoparticle*);
AKND-FS – apkonvertuojančios nanodalelės ir fotosensibilizatoriaus kompleksas (-ai);
Au ND – aukso nanodalelės;
Au NK – aukso nanoklasteris (-iai);
Ce₆ – chlorinas e₆;
DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle ląstelių mitybinė terpė (*angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*);
DPBS – Dulbecco fosfatinio buferio druskų tirpalas (*angl. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*);
E – energijos lygmuo;
FL – fotoluminescencija;
FNT – fotosensibilizuota navikų terapija;
FS – fotosensibilizatorius (-iai);
G – pagrindinis nesužadintas energijos lygmuo (*angl. ground state*);
Hb – hemoglobinas;
HbO₂ – oksiduotas hemoglobinas;
Hp – hematoporfirinas;
HpD – hematoporfirino darinys;
IR – infraraudoji (šviesa/spinduliuotė);
JSA – jaučio serumo albuminas;
JSA-Au NK – jaučio serumo albuminu stabilizuoti aukso nanoklasteriai;
LDH – laktatdehidrogenazė;
MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės;
MRT – magnetinio rezonanso tomografija;
ND – nanodalelė (-ės);
ND-FS – nanodalelės ir fotosensibilizatoriaus kompleksas (-ai);
PBS – fosfatinio buferio druskų tirpalas (*angl. Phosphate-Buffered Saline*);
PET – pozitronų emisijos tomografija;
PpIX – protoporfirinas IX;
Rh – rezus faktorius;
RNS – aktyvios azoto formos (*angl. reactive nitrogen species*);
ROS – aktyvios deguonies formos (*angl. reactive oxygen species*);
SA – skaitinė apertūra (*angl. numerical aperture*);
UV – ultravioletinė (šviesa/spinduliuotė);
ŽSA – žmogaus serumo albuminas.

TURINYS

SANTRUMPOS	5
1. ĮVADAS	8
1.1. Aktualumas	9
1.2. Darbo tikslas ir uždaviniai	9
1.3. Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė	10
1.4. Autorės indėlis	13
2. LITERATŪROS APŽVALGA	14
2.1. Teranostika.....	14
2.2. Fotosensibilizuota navikų terapija.....	16
2.3. Fluorescencinė diagnostika	20
2.4. Audinių optinio skaidrumo langas	23
2.5. Nanotechnologijos vėžio teranostikai	25
2.5.1. Baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai	27
2.5.2. Aukso nanoklasterių pritaikymas vėžio teranostikai	29
2.5.3. Retųjų žemių metalų nanodalelės	31
2.5.4. Apkonvertuojančių nanodalelių ir FS kompleksai	36
2.6. Nanodalelių pristatymas į naviką	40
2.7. Mezenchiminės kamieninės ląstelės	44
3. MEDŽIAGOS IR METODAI	47
3.1. Nanodalelių sintezė	47
3.1.1. Aukso nanoklasterių sintezė	47
3.1.2. Retųjų žemių metalų nanodalelių sintezė	48
3.2. Nanodalelių savybių tyrimai	49
3.2.1. Spektroskopiniai tyrimai	49
3.2.2. Hidrodinaminio skersmens matavimai	49
3.2.3. Aktyvių deguonies formų generavimo tyrimas	49
3.3. Nanodalelių tyrimai ląstelėse	51
3.3.1. Vėžinių ląstelių linijos.....	51
3.3.2. MKL išskyrimas ir charakterizavimas.....	52

3.3.3.	Ląstelių kultivavimas	54
3.3.4.	Nanodalelių kaupimosi ląstelėse tyrimai.....	54
3.3.5.	Nanodalelių citotoksiškumo tyrimai.....	55
3.3.6.	Fotosensibilizacinio poveikio įvertinimas	56
3.3.7.	Trimatės ląstelių kultūros formavimas	57
3.3.8.	Ekspperimentai su ląstelių sferoidais	57
4.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	59
4.1.	Baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai	59
4.1.1.	Aukso nanoklasterių charakterizavimas	59
4.1.2.	Aktyvių deguonies formų generavimo tyrimas	63
4.1.3.	Susikaupimas vėžinėse ląstelėse.....	65
4.1.4.	Biosuderinamumas	67
4.1.5.	Fotodinaminis poveikis vėžinėms ląstelėms.....	68
4.2.	Retųjų žemių metalų nanodalelių ir chlorino e ₆ kompleksai.....	73
4.2.1.	Retųjų žemių metalų nanodalelių spektrinės savybės	75
4.2.2.	Komplekso sudarymas ir charakterizavimas	77
4.2.3.	Singuletinio deguonies generavimo tyrimai	80
4.2.4.	Susikaupimas vėžinėse ląstelėse ir biosuderinamumas	82
4.2.5.	LiYF ₄ -Ce ₆ komplekso fotosensibilizacinis poveikis	86
4.2.6.	Tyrimai ląstelių sferoiduose	88
4.2.7.	MKL kaip nanodalelių nešikliai	89
4.2.8.	Nanodalelių pernešimas sferoiduose naudojant MKL.....	93
5.	APIBENDRINIMAS	96
6.	IŠVADOS	100
7.	SUMMARY	101
8.	LITERATŪROS SĄRAŠAS / REFERENCES.....	121
9.	PADĖKA	135
10.	TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ.....	136
11.	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	139
12.	REZULTATŲ VIEŠINIMAS.....	141

1. ĮVADAS

Sparti nanotechnologijų plėtra per pastaruosius dešimtmečius siūlo novatoriškus sprendimus ir medicinoje. Nanodalelės kuriamos ir tiriamos kaip diagnostiniai žymenys arba kaip nešikliai, kurie pagerintų vaistų pristatymą, įveiktų biologinius barjerus, mažinančius gydymo efektyvumą, ir leistų pritaikyti individualizuotą gydymą kiekvienam pacientui (Mitchell ir kt., 2021; Pallares ir kt., 2022). Šiuo metu klinikoje jau yra naudojami vaistai, sukurti panaudojant nanotechnologijas. Lipidų ir polimerų pagrindų sukurtos nanodalelės naudojamos efektyviam vaistų nunešimui į tikslines ląsteles (Mitchell ir kt., 2021). Taip pat daug tyrimų atliekama ir su neorganinėmis nanodalelėmis, dalis jau yra patvirtintos kaip vaistai klinikai (Mitchell ir kt., 2021), kitos aktyviai šiuo metu tyrinėjamos (Alphandéry, 2020).

Pastaraisiais metais daug pastangų skiriama nanomedžiagų, kurios galėtų būti naudojami tiek vėžio diagnostikai, tiek gydymui, tyrimams (Pallares ir kt., 2022). Ši sritis vadinama vėžio teranostika. Vienas iš teranostikos tikslų yra sukurti daugiafunkčę platformą, kuri leistų naudojant vieną nanomedžiagą ar nanokompozitą pasiekti kelis norimus efektus. Tokia daugiafunkcė platforma skirta vėžio teranostikai, pagerintų ankstyvąją diagnostiką, sutrumpintų gydymo pradžios laukimo laiką ir prailgintų gyvenimo trukmę po gydymo.

Viena iš vėžio teranostikos krypčių yra fluorescencinės diagnostikos ir fotosensibilizuotos navikų terapijos (FNT) derinimas vienoje platformoje. Porfirinų tipo fotosensibilizatoriai (FS), tokie kaip hematoporfirinas (Hp) arba chlorinas e_6 (Ce_6), gali būti laikomi teranostinėmis medžiagomis, nes tuo pat metu juos galima panaudoti kaip žymeklius neinvazinei optinei diagnostikai, ir FNT, kaip fotosensibilizaciniu aktyvumu pasižyminčias medžiagas. Tačiau porfirinų tipo FS turi trūkumų, tokių kaip nespecifiškas susikaupimas sveikuose audiniuose, mažas tirpumas vandenyje, mažas fotostabilumas, taip pat citotoksiškumas tamsoje. Pastaruoju metu buvo sukurta nemažai FS, kurių savybės leidžia išvengti daugumos trūkumų, tačiau specifiškas FS susikaupimas navike vis dar išlieka aktuali problema (Sarbadhikary ir kt., 2021). Po intraveninės injekcijos FS linkę kauptis ne tik navike, bet ir sveikuose audiniuose (Castano ir kt., 2005). Odoje susikaupus FS, pacientas tampa jautrus šviesai, o tai apsunkina gydymą. Tobulėjant nanotechnologijoms imta ieškoti įvairių nanomedžiagų, kurios pakeistų porfirinų tipo FS ir neturėtų aukščiau išvardintų trūkumų.

1.1. Aktualumas

Nanomedžiagų pritaikymas vėžio teranostikai galėtų būti ilgai lauktas proveržis onkologijoje. Nanodalelės (ND) gali būti panaudotos kaip teranostinės platformos fluorescencinei vėžio diagnostikai ir FNT dviem būdais: pati ND gali atlikti dvi funkcijas arba ND turi būti sujungta su klasikiniais FS.

Siekiant sukurti nanodaleles, kurios pačios atliktų FS funkciją, buvo atlikta nemažai bandymų. Šiuo metu perspektyviausi ir vieninteliai, kurie savo fotosensibilizacinėmis savybėmis gali lygintis su porfirinų tipo FS, yra aukso nanoklasteriai (Au NK) (Tavakkoli Yaraki ir kt., 2022). Au NK sintezės metu gali būti stabilizuojami įvairiais ligandais, vienas populiariesnių – įvairūs baltymai (Zhang ir kt., 2021a). Baltymų panaudojimas sintezėje leidžia susintetinti biosuderinamus Au NK, o ir pati sintezė laikoma žaliaja sinteze, kadangi jos metu nėra naudojami agresyvūs cheminiai reagentai. Itin maži, biosuderinami, fotoluminescuojantys ir fotosensibilizacinėmis savybėmis pasižymintys Au NK šiuo metu yra viena perspektyviausių teranostinių nanomedžiagų (Cifuentes-Rius ir kt., 2021).

Dideliu proveržiu nanoteranostikos srityje galima laikyti ir retaisiais žemių metalais legiruotų apkonvertuojančių sistemų atradimą. Nors apkonversijos reiškinys yra žinomas seniai, tačiau tik pastaruoju metu sukūrus biosuderinamas apkonvertuojančias nanodaleles (AKND) yra įmanoma jį praktiškai realizuoti ir panaudoti biomedicininiais tikslais (Chen ir kt., 2014). Būdamos netoksiškos, turėdamos didelį anti-Stokso poslinkį bei plačią emisiją raudonojoje ir infraraudonojoje (IR) srityse šios nanodalelės gali būti pritaikomos giluminėje navikų diagnostikoje ir terapijoje. Apkonversijos emisija yra tinkama FS sužadimui, tad tokių AKND bei FS kompleksai galėtų veikti kaip daugiafunkcės nanomedžiagos (Wang ir kt., 2011). Be to, šiame darbe parodome, kad naudojant retųjų žemių metalų nanodaleles, galima sukurti sistemas, kurių diagnostinė ir terapinė funkcijos būtų atskirtos viena nuo kitos ir valdomos skirtingo bangos ilgio šviesa. Toks atskyrimas leidžia užtikrinti, kad atliekant naviko diagnostiką nevyks jokie papildomi procesai ir bus išvengiama sveikų audinių pažeidimo.

1.2. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas:

Ištirti biosuderinamų aukso nanoklasterių ir funkcionalizuotų retųjų žemių metalų nanodarinių panaudojimo vėžio teranostikoje potencialą.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti baltymais stabilizuotų aukso nanoklasterių bei retųjų žemių metalų ir fotosensibilizatoriaus Ce₆ kompleksų optines ir fotosensibilizacines savybes.
2. Nustatyti baltymais stabilizuotų aukso nanoklasterių ir retųjų žemių metalų kompleksų su fotosensibilizatoriumi Ce₆ kaupimosi ir pasiskirstymo dėsningumus skirtingo piktybiškumo vėžinėse ląstelėse MCF-7 ir MDA-MB-231.
3. Įvertinti skirtingais baltymais stabilizuotų aukso nanoklasterių fotosensibilizacinį poveikį ir teranostines savybes krūties vėžinėms ląstelėms *in vitro*.
4. Nustatyti retųjų žemių metalų nanodalelių kaupimąsi ir pasiskirstymą navikinių darinių modelyje – vėžinių ląstelių trimačiuose sferoiduose.
5. Nustatyti ar retųjų žemių metalų ir Ce₆ kompleksai atlieka fotosensibilizatoriaus funkciją vėžinių ląstelių monosluoksniuose ir sferoiduose, švitinant 980 nm spinduliuote.
6. Ištirti ar odos mezenchiminių kamieninių ląstelių panaudojimas pagerina retųjų žemių metalų nanodalelių ir Ce₆ komplekso pernašą bei jo fotosensibilizacinį poveikį vėžinių ląstelių MDA-MB-231 sferoiduose.

1.3. Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Įvairūs Au NK jau kurį laiką yra nagrinėjami kaip galima teranostinė priemonė (Cifuentes-Rius ir kt., 2021; van de Looij ir kt., 2022). Dėl savo savybių, Au NK galėtų būti pritaikyti skirtingiems diagnostikos ar gydymo metodams (van de Looij ir kt., 2022). Au NK yra tiriami kaip alternatyva molekuliniams FS ir buvo parodyta, kad jie gali generuoti singuletinį deguonį (¹O₂) (Ho-Wu ir kt., 2017). Doktorantūros vykdymo metu buvo ištirti jaučio serumo albuminu stabilizuotų Au NK (JSA-Au NK) savybės ir pademonstruota, kad JSA-Au NK gali generuoti ne tik singuletinį deguonį, bet ir kitas aktyvias deguonies formas (*angl. reactive oxygen species* – ROS), tokias kaip peroksidai arba aktyvios azoto formos (*angl. reactive nitrogen species* – RNR), tokias kaip peroksinitritai (Poderys ir kt., 2020). Ši publikacija yra pirmoji, kuri nagrinėja Au NK gebėjimą generuoti kitas aktyvias deguonies formas, nei ¹O₂. Porfirinų tipo FS daugiausiai generuoja

$^1\text{O}_2$ ir tik nedidelę dalį (apie 5 %) kitų aktyvių deguonies formų, tad dažniau tiriant nanodaleles nebandoma nustatyti ar vyksta kitų ROS generacija. Tuo tarpu nanodalelių fotosensibilizacinės savybės nėra gerai iširtos, todėl svarbu tirti ne tik $^1\text{O}_2$, bet ir kitų ROS arba RNS susidarymą.

Au NK sintezei panaudoti galima įvairius baltymus (Xie ir kt., 2009; Dixon ir Egusa, 2021). Doktorantūros studijų metu atlikti tyrimai parodė, kad Au NK gali būti sintetinami žmogaus kraujo plazmoje *in vitro*, tokiu būdu sukuriant biosuderinamas nanodaleles personalizuotai vėžio teranostikai (Jarockyte ir kt., 2022a). Tokie personalizuoti Au NK anksčiau mokslinėje literatūroje nebuvo aprašyti.

Panaudojant retųjų žemių metalų nanodaleles galima sukurti nanodalelės ir FS teranostinį kompleksą, kuris būtų aktyvuojamas naudojant artimąją infraraudonąją šviesą (Lu ir kt., 2022; Valle ir kt., 2022). Nors tokias sistemas tiria ne viena mokslininkų laboratorija, tačiau literatūroje aprašytos sistemos naudoja vieną bangos ilgį tiek diagnostikai, tiek terapijai. Tokios sistemos ne visada yra tinkamos, kadangi kai kuriais atvejais labai svarbu atlikti diagnostinius tyrimus prieš pradedant FNT. Doktorantūros laikotarpiu buvo tiriamos retųjų žemių metalų nanodalelės, kurios sudarytos iš skirtingų sluoksnių, atliekančių skirtingas funkcijas. Kiekvieno sluoksnio funkcija yra „įjungiamą“ atskiru bangos ilgiu. Tokiu būdu vienoje dalelėje galima atskirti vėžio diagnostiką ir gydymą (Skripka ir kt., 2019).

Atliekant pradinius nanodalelių tyrimus *in vitro* labai svarbu pasirinkti tinkamą modelinę sistemą. Šiuo metu vis dar auksiniu standartu laikomi ląstelių monoslauksniai, su kuriais lengva ir patogiu dirbti. Tačiau šis biologinis modelis yra per daug supaprastintas ir neatitinka sudėtingos vėžinio audinio struktūros bei naviko mikroaplinkos. Daug tikslesnis biologinis modelis yra eksperimentiniai gyvūnai, tačiau pradinėse tyrimų stadijose naudoti gyvūnus yra netikslinga. Kaip alternatyvą galima naudoti trimates (3D) ląstelių kultūras, pavyzdžiui, ląstelių sferoidus (Fitzgerald ir kt., 2015). Ląstelių sferoiduose dominuoja ląstelė-ląstelė sąveika, taip pat formuojasi tarpląstelinis matiksas ir susidaro difuzinis maisto medžiagų bei deguonies gradientas. Tokiomis pačiomis savybėmis pasižymi ir maži navikai, dar neturintys kraujagyslių tinklo (Costa ir kt., 2016). Šis biologinis tyrimų modelis vis dažniau pritaikomas nanomedžiagų tyrimuose, tačiau vis dar dauguma mokslininkų renkasi ląstelių monoslauksnius. Todėl labai svarbu plėsti ląstelių sferoidų panaudojimą nanodalelių tyrimuose. Šiame darbe buvo pasirinkta dalį eksperimentų atlikti ląstelių sferoiduose. Gauti rezultatai parodė, kad nanodalelių prasiskverbimas 3D ląstelių sferoiduose yra ribojamas, didesnis susikaupimas stebimas ląstelių sferoidų išorėje, o į

centrinę dalį nanodalelės nepraeina. Dėl to buvo ieškoma alternatyvaus būdo nanodalelių pernešimui.

Šiame darbe yra tiriamas iš odos išskirtų mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) gebėjimas pernešti nanodaleles į vėžinių ląstelių sferoidus. Ankstesniuose tyrimuose buvo parodyta, kad MKL geba pernešti nanodaleles į naviką ir tokiu būdu pagerinti priešvėžinį jų poveikį (Dapkute ir kt., 2021). Dažniausiai literatūroje aprašomos MKL išskirtos iš kaulų čiulpų ar riebalinio audinio. Oda, kaip MKL šaltinis, nagrinėjama neseniai, todėl šiame darbe aprašyti tyrimai prisideda prie odos MKL pažinimo. Tyrimų, kuriuose būtų nagrinėjama MKL migracija į ląstelių sferoidus, yra labai mažai (Ferreira ir kt., 2021), o tokių, kuriuose būtų naudojamos iš odos išskirtos MKL – nėra visai.

Ginamieji teiginiai:

1. Kraujo serumo baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai regimosios šviesos poveikyje generuoja aktyvias deguonies formas, o fotosensibilizatoriumi funkcionalizuotos retųjų žemių metalų nanodalelės švitinamos artimąja infraraudonąja šviesa generuoja singuletinį deguonį.
2. Kraujo serumo baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai ir fotosensibilizatoriumi funkcionalizuotos retųjų žemių metalų nanodalelės kaupiasi vėžinėse ląstelėse ir tamsoje yra netoksiškos.
3. Kraujo serumo baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai, susikaupę vėžinėse ląstelėse, šviesos poveikyje generuoja aktyvias deguonies formas, kurios inicijuoja vėžinių ląstelių žūtį.
4. Fotosensibilizatoriumi funkcionalizuotų retųjų žemių metalų nanodalelių prasiskverbimas į trimačius ląstelių sferoidus yra ribotas.
5. Švitinant 980 nm spinduliuote fotosensibilizatoriumi funkcionalizuotas retųjų žemių metalų nanodaleles ląstelių monosluoksniuose ir sferoiduose, susidaro singuletinis deguonis, kuris sukelia ląstelių žūtį.
6. Mezenchiminės kamieninės ląstelės kaupia fotosensibilizatoriumi funkcionalizuotas retųjų žemių metalų nanodaleles ir užtikrina jų pernašą naviko modelyje – 3D ląstelių sferoiduose.

1.4. Autorės indėlis

Disertacijos autorė yra pagrindinė tyrimo idėjos įgyvendintoja ir tyrimų ląstelių monosluoksniuose ir 3D ląstelių sferoiduose pagrindinė tyrėja. Autorė atliko eksperimentus, reikalingus nanodalelių charakterizavimui, planavo ir atliko nanodalelių kaupimosi ląstelėse bei biosuderinamumo tyrimus, fotosensibilizacinio poveikio įvertinimo ląstelių monosluoksniuose ir 3D ląstelių sferoiduose eksperimentus, nanodalelių pernešimo mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis vėžinių ląstelių sferoiduose tyrimus. Autorė analizavo, apdoravo ir interpretavo visus gautus rezultatus, juos pristatė mokslinėse konferencijose bei jų pagrindu su bendraautoriais parengė publikacijas. Ji yra dviejų publikacijų, parašytų disertacijos tema, pirmoji autorė. Remdamasi doktorantūros metu paruoštomis publikacijomis, autorė paruošė disertaciją.

Darbo vadovas prof. habil. dr. Ričardas Rotomskis suformulavo eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo interpretuojant rezultatus, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą konferencijoms.

Prof. dr. Vitalijus Karabanovas konsultavo planuojant ir vykdant eksperimentus, analizuojant gautus rezultatus, dalyvavo rengiant mokslines publikacijas ir medžiagą konferencijoms.

Aukso nanoklasterių sintezę bei dalį spektrinių matavimų atliko jaunesnysis mokslo darbuotojas Vilius Poderys. Taip pat V. Poderys surinko 980 nm lazerinę sistemą reikalingą vaizdinimui konfokaliniu mikroskopu bei nanodalelių fotosensibilizacinio poveikio tyrimams vėžinėse ląstelėse.

Retųjų žemių metalų nanodalelių sintezę atliko dr. Artiom Skripka, Kvebeko universiteto Nacionaliniame mokslinių tyrimų institute, Kanadoje. Mokslininkų grupei vadovauja prof. dr. Fiorenzo Vetrone.

Studentė Alėja Marija Daugėlaitė išskyrė mezenchimines kamienines ląsteles, naudodama dr. Dominykos Dapkutės metodiką (Dapkute ir kt., 2021), taip pat vadovaujama disertacijos autorės atliko eksperimentus su šiomis ląstelėmis ir analizavo gautus rezultatus.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

Vėžys išlieka viena sudėtingiausių ligų, kurios gydymo metu yra būtinos daugiapakopės diagnostikos ir gydymo procedūros. Sparčiai vystantis nanotechnologijoms, pastaruoju metu vis dažniau onkologijoje pritaikomi įvairūs nanomedicininiai preparatai (Shan ir kt., 2022). Per pastarąjį dešimtmetį daug pastangų buvo skirta nanomedžiagoms, kurios gali būti naudojamos tiek vėžio diagnostikai, tiek terapijai. Tokios nanomedžiagos, atliekančios dvi funkcijas, vadinamos teranostinėmis. Sujungus diagnostiką ir gydymą galima pašalinti daugiapakopes medicininės procedūras, anksčiau diagnozuoti onkologinius pakitimus, sumažinti gydymo pradžios laukimo laiką ir pagerinti pacientų atsigavimą po ligos.

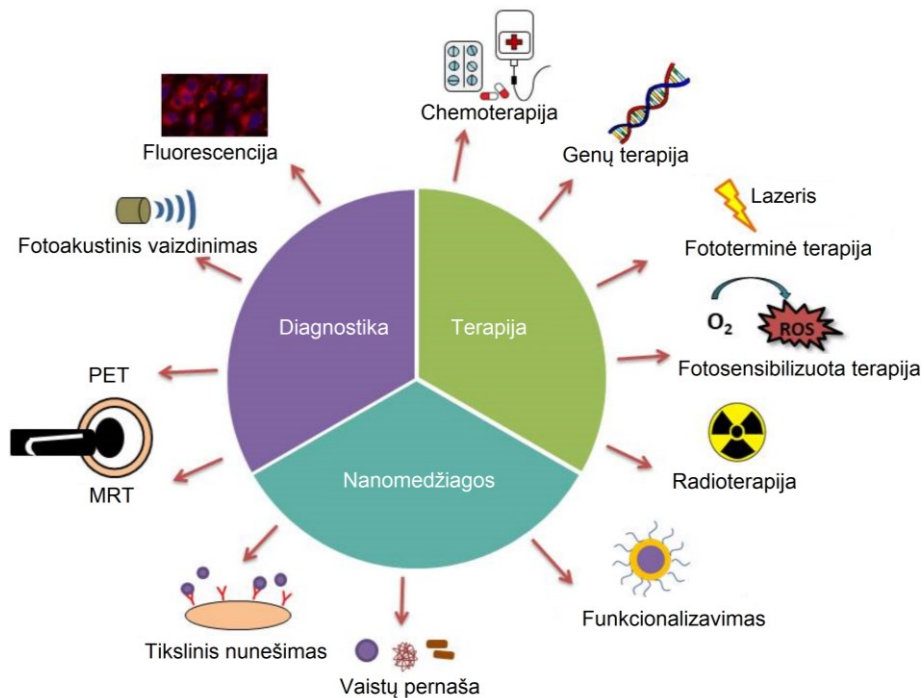
2.1. Teranostika

Teranostika – tai mokslo sritis, tyrinėjanti medžiagas ir metodus, kurie galėtų būti pritaikyti ir diagnostikai, ir terapijai. Tai gali būti priemonės, kurios leidžia diagnozuoti, o po to taikyti gydymą, neatliekant papildomų žingsnių. Taip pat kai kuriais atvejais pirmiausia taikomas gydymas, o vėliau atliekama diagnozė, siekiant stebėti ankstyvą atsaką į gydymą ir numatyti gydymo veiksmingumą. Kita vertus, kai kuriais atvejais diagnostika ir terapija yra atliekama kartu.

Istoriškai vėžio teranostika pradėta taikyti anksčiau nei atsirado pats terminas. 1941 m. Saul Hertz pirmasis pritaikė radioaktyvųjį jodą pacientams, sergantiems hipertiroidizmu, o vėliau ir skydliaukės vėžiu, diagnostikai ir gydymui (Hertz, 2019). Iki tol radioaktyvus jodas buvo naudojamas tik diagnostikai. 1946 m. Samuel M. Seidlin, sekdamas S. Hertz darbais, publikavo tyrimą apie radioaktyviojo jodo panaudojimą metastazavusio skydliaukės vėžio gydymui (Seidlin ir kt., 1946). Šie darbai davė pradžią branduolinei vėžio teranostikai.

Terminą „teranostika“ 1998 m. pranešime spaudai pirmasis pavartojo „PharmaNetics“ vadovas John Funkhouser, norėdamas aprašyti medžiagą, leidžiančią kartu diagnozuoti, gydyti ir stebėti pacientą gydymo metu (Idée ir kt., 2013). 2002 m. F. J. Picard publikavo apžvalginį straipsnį apie molekulinį įrankių panaudojimą infekcinių ligų teranostikai (Picard ir Bergeron, 2002). 2006 m. J. R. McCarthy ir kt. publikavo straipsnį, kuriame aprašė nanodaleles aterosklerozės teranostikai (McCarthy ir kt., 2006). Nuo 2008 m. pradėtas tirti teranostinių nanodalelių pritaikymas onkologijoje, tačiau pirmieji straipsniai buvo apžvalginiai, juose buvo aprašyta pati teranostikos idėja, o praktinis veikimas buvo pademonstruotas vėliau

(Hartman ir kt., 2008; Sumer ir Gao, 2008). 2011 m. pradėtas leisti tarptautinis mokslinis žurnalas „Theranostics“ ir susidomėjimas šia sritimi ėmė ženkliai augti. Tikimasi, kad teranostinių priemonių pritaikymas medicinoje pagerins skirtingų ligų, įskaitant įvairių tipų vėžį (Palekar-Shanbhag ir kt., 2013; Sharma ir kt., 2017), neurodegeneracinius sutrikimus (Ramanathan ir kt., 2018; Sharma ir kt., 2019) ir širdies ir kraujagyslių ligas (Tang ir kt., 2012; Cattaneo ir kt., 2019), gydymo veiksmingumą, taip užtikrinant geresnę individualizuotą medicininę priežiūrą. Visgi daugiausiai dėmesio šiuo metu sulaukia vėžio teranostika.



1 pav. Nanomedžiagų pritaikymas vėžio diagnostikai ir terapijai. Nanotechnologijos leidžia sukurti medžiagas, kurios galėtų atlikti kelias skirtingas funkcijas. Adaptuota pagal Bhushan ir kt., 2021.

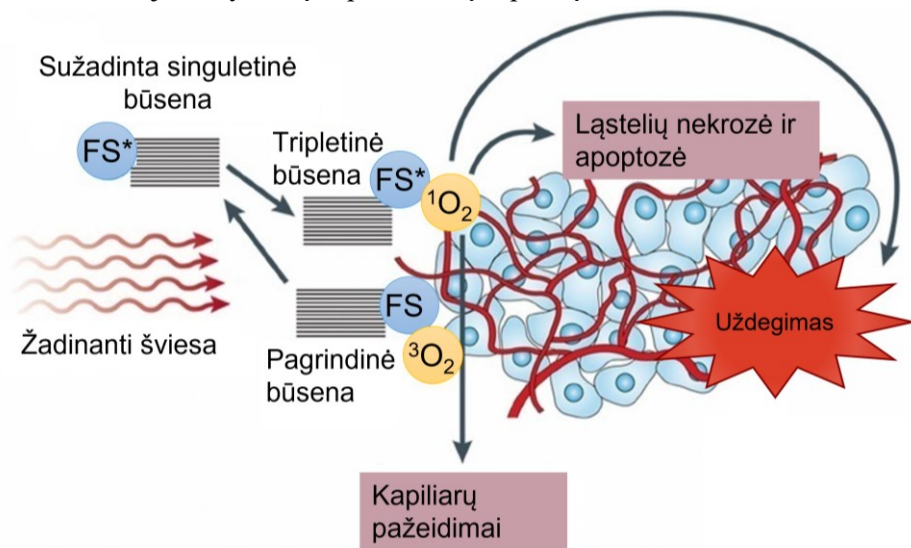
Vėžio teranostika, kaip rodo pavadinimas, yra kombinuota vėžio diagnozės ir gydymo priemonė, kuri leidžia sumažinti gydymo pradžios laukimo laiką bei palengvinti pacientų priežiūrą. Tokių priemonių taikymas yra būtinas individualizuotam vėžio gydymui ir paciento stebėjimui. Vėžio teranostika gali apjungti keletą skirtingų diagnostikos ir terapijos metodų. Fluorescencinė diagnostika dažnai kombinuojama su FNT arba fototerminė terapija. Magnetinio rezonanso tyrimas (MRT) gali būti taikomas kartu su hipertermine terapija. Pozitronų emisijos tomografija (PET) – kartu su radioterapija. Paskutiniu metu daugiau dėmesio skiriama ir daigiafunkcėms medžiagoms,

kurias galima panaudoti keliems skirtingiems vaizdinimo būdams (multimodaliniam vaizdinimui) ir vienam ar keliems gydymo metodams. Daugiafunkcės medžiagos dažniausiai kuriamos pasitelkiant nanotechnologijas. 1 pav. schematiškai pavaizduota, kaip galima panaudoti nanomedžiagas vėžio diagnostikai ir terapijai. Siekiama sukurti teranostines nanodaleles, kurios atliktų kelias išvardintas funkcijas.

Teranostinių metodų ir medžiagų pasirinkimas nuolatos didėja. Visgi optiniai metodai išlieka patrauklūs dėl savo paprastumo, pigumo ir saugumo. Todėl šiame darbe daugiau dėmesio skiriama FNT ir fluorescencinės diagnostikos apjungimui ir pritaikymui onkologinių ligų gydymui.

2.2. Fotosensibilizuota navikų terapija

Fotosensibilizuota navikų terapija – tai onkologinių ligų gydymas, kurio metu šviesa veikia į organizmą įvestas pigmentų molekules, paversdama jas toksiškais arba trikdančiais medžiagų apykaitą produktais (Rotomskis ir kt., 2002). FS parenkamas toks, kad sugertų šviesos energiją, perduotų ją kitoms molekulėms, jas aktyvuotų, o pats išliktų nepakitęs.



2 pav. Principinė schema, vaizduojanti fotosensibilizacijos procesą navike. Fotosensibilizatorius (FS) sugeria šviesą ir pereina į trumpai gyvojančią sužadintą singuletinę būseną (FS*). Kadangi ši būsena yra nestabili, sensibilizatorius gali pereiti į ilgai gyvojančią sužadintą tripletinę būsena, iš kurios energija gali būti perduota tripletinėje būsenoje esančiam deguoniui ($^3\text{O}_2$). Sužadintas deguonis pereina į singuletinę būseną ($^1\text{O}_2$). Singuletinis deguonis $^1\text{O}_2$ gali tiesiogiai sukelti vėžinių ląstelių nekrozę ir/arba apoptozę, taip pat gali pažeisti naviko kapiliarus ir taip sutrikdyti naviko aprūpinimą maisto medžiagomis, bei deguonimi arba sukelti uždegiminį procesą ir tokiu būdu pritraukti imunines ląsteles į naviką. Adaptuota pagal Castano ir kt., 2006.

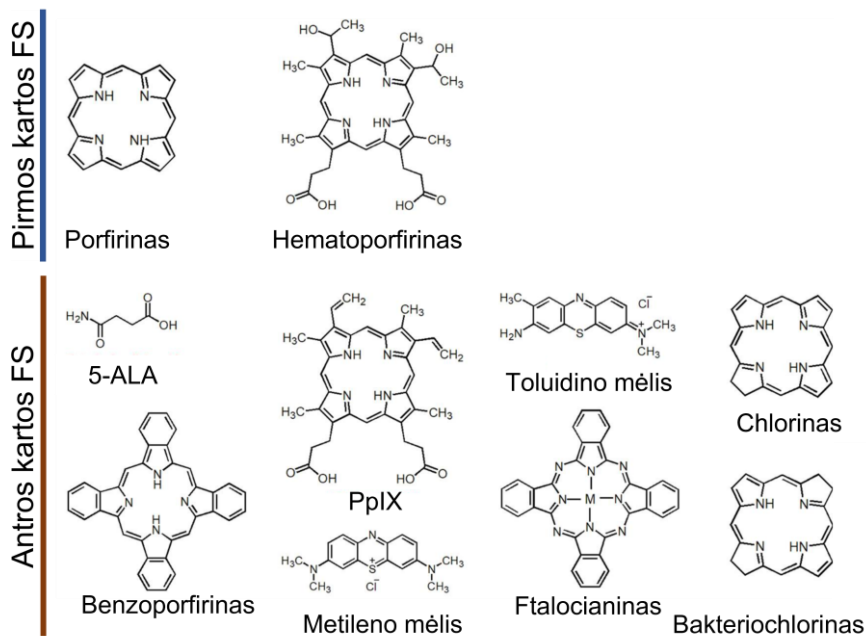
FNT metu yra naudojami du netoksiški komponentai – FS ir šviesa, kuriuos sujungus gaunamas toksinis poveikis vėžinėms ląstelėms (2 pav.). FS, sužadintas šviesa, perduoda sužadinimo energiją tripletinėje būsenoje esančiam deguoniui. Deguonis gavęs papildomos energijos pereina į sužadintą singuletinę būseną ir susidaro chemiškai aktyvus singuletinis deguonis. Tačiau energija gali būti perduodama ir kitoms molekulėms, tokiu atveju susidaro įvairūs radikalai arba kitos chemiškai aktyvios molekulės (Castano ir kt., 2005). Tiek $^1\text{O}_2$, tiek kiti ROS arba RNR pažeidžia ląsteles ir gali sukelti apoptozę, nekrozę arba autofagiją. Kuris ląstelės žūties kelias bus aktyvuotas priklauso nuo FS viduląstelinės lokalizacijos, FNT dozės ir naudojamos šviesos intensyvumo, deguonies kiekio aplinkoje bei ląstelių tipo (Yoo ir Ha, 2012).

FNT tyrimų pradžia yra laikomi 1900 m., kai Oscar Raab pastebėjo, kad ląsteles paveikus organiniais pigmentais ir vėliau apšvitinus šviesa, ląstelės žūsta (Zhang ir Lovell, 2012). Vien tik pigmentai arba vien šviesa tokio poveikio ląstelėms neturėjo. O. Raab padarė išvadą, kad pigmentai sugeria šviesą, susidaro toksiškos medžiagos ir ląstelės žūsta. 1903 m. Herman von Tappeiner ir A. Jesionek paskelbė straipsnį, kuriame iškėlė FNT idėją (Zhang ir Lovell, 2012). Straipsnyje buvo siūloma naudoti eozino 5 % vandeninį tirpalą ir švitinimą šviesa įvairiems odos susirgimams gydyti. Straipsnyje buvo pateikti ir klinikiniai rezultatai gydant odos vėžį.

Susidomėjimas FNT galimybėmis augo, imta ieškoti kitų pigmentų, kurie galėtų būti FS. 1911 m. Hausmann pastebėjo sensibilizuojantį Hp poveikį (Zhang ir Lovell, 2012). 1924 m. Policard paskelbė, kad Hp gerai kaupiasi navikinėse ląstelėse, o 1942 m. Auler ir Banzer eksperimentuodami su gyvūnais parodė, kad Hp selektyviai kaupiasi navikiniame audinyje, taip pat buvo nustatytas sensibilizuojantis poveikis navikams (Zhang ir Lovell, 2012). Hp paveikus acto ir sieros mišiniu buvo gautas hematoporfirino darinys (HpD). HpD navikuose kaupėsi geriau, nei anksčiau atrastas Hp, be to juos buvo galima sužadinti raudona šviesa, kuri geriau prasiskverbia pro audinius, todėl jie buvo pradėti naudoti navikų diagnostikoje. Galiausiai, išstobulinus sintezę ir gryninimą, HpD pradėtas gaminti kaip vaistas fotofrinas ir imtas naudoti FNT (Josefsen ir Boyle, 2008).

Natūralios kilmės porfirinai, tokie kaip ir Hp ir jo dariniai, yra laikomi pirmosios kartos FS (3 pav.). Nors šie junginiai yra lengvai susintetinami, kaupiasi navikuose, ir pasižymi fotosensibilizacinėmis savybėmis, tačiau kaip FS turi nemažai trūkumų. Didžiausias trūkumas yra tai, kad pirmosios kartos FS geriausiai sugeria 360-440 nm srityje. Tokia šviesa neprasiskverbia giliai į audinius, todėl naudojant pirmosios kartos FS galima gydyti tik paviršinius

navikus (odos, skrandžio, šlapimo pūslės ir pan.). Be to, šių sensibilizatorių $^1\text{O}_2$ generacijos kvantinis našumas yra gana mažas, dėl to reikalingos didelės švitinimo dozės. Kita problema – nepakankamas kaupimosi selektyvumas. Lyginant su sveikais audiniais, FS dėl didesnio pralaidumo kraujagyslių šiek tiek geriau kaupiasi navike bei ilgiau jame užsilaiko dėl prasčiau išvystytos limfinės sistemos, tačiau FS susikaupia ne tik navikuose, bet ir odoje, todėl pacientas po procedūros ilgą laiką būna jautrus šviesai (Zhang ir Lovell, 2012; Gunaydin ir kt., 2021).



3 pav. Pirmos ir antros kartos fotosensibilizatorių pavyzdžiai. Adaptuota pagal Gunaydin ir kt., 2021.

Siekiant išvengti pirmos kartos FS trūkumų, buvo ieškoma kitų pigmentų, turinčių fotosensibilizacinių savybių. Antrosios kartos FS, priešingai nei pirmosios, yra homogeninės, žinomos struktūros medžiagos. Žinoma struktūra leido geriau ištirti medžiagų savybes bei jų sąveiką su biologiniais objektais. Šiai grupei priskiriami chlorinas ir jo dariniai, bakteriochlorinas, ftalocianinai, benzoporfirinas, taip pat hemo sintezės pirmtakas 5-aminolevulininė rūgštis (5-ALA) ir vienas iš hemo sintezės šalutinių produktų protoporfirinas IX (PpIX) (3 pav.). Antrosios kartos FS pasižymi gera šviesos sugertimi bei fluorescencija raudonoje spektro dalyje (650-850 nm), kuri patenka į pirmąjį audinių skaidrumo langą. Tokia sugertis leidžia sužadinti FS, esančius giliau audinyje (iki kelių milimetrų gylio). Raudona šviesa neturi poveikio audinių ląstelėms, jei jose nėra FS. Be to,

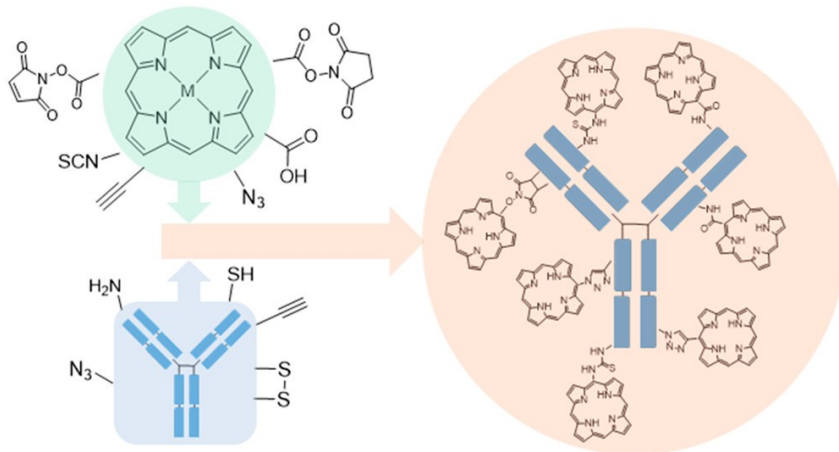
antros kartos FS pasižymi kur kas didesniu $^1\text{O}_2$ generacijos kvantiniu našumu, lyginant su Hp. Taip pat antros kartos FS greičiau pasišalina iš sveikų audinių (Gunaydin ir kt., 2021). Deja, antrosios kartos FS nepasižymi selektyviu susikaupimu navike, jų kaupimasis panašus į pirmosios kartos FS (Mironov, 1996). Nors antros kartos FS gali būti naudojami įvairių tipų vėžiui gydyti, jie vis tiek gali pakenkti sveikiems audiniams dėl didelio toksiškumo ir mažo stabilumo (Gunaydin ir kt., 2021).

Nepaisant išvardintų trūkumų, šiuo metu klinikoje yra naudojami tiek pirmos, tiek antros kartos FS. HpD pagrindu sukurtas vaistas fotofrinas patvirtintas šlapimo pūslės, stemplės, plaučių, gimdos kaklelio onkologinių ligų gydymui (Sarbadhikary ir kt., 2021). Preparatas su 5-ALA yra patvirtintas ne melanomos tipo odos piktybiniams pakitimams, tokiems kaip bazalioma ir plokščialąstelinė karcinoma, arba iki vėžiniams pakitimams, tokiems kaip aktininė keratozė, gydyti (Gunaydin ir kt., 2021; Sarbadhikary ir kt., 2021). Pati 5-ALA nėra fotosensibilizatorius, tačiau yra endogeninio fotosensibilizatoriaus PpIX pirmtakas. PpIX susidaro kraujo hemo sintezės ciklo metu, kaip pašalinis produktas. Chlorino pagrindu sukurti vaistai gali būti naudojami galvos ir kaklo, prostatos, kasos, plaučių navikams gydyti (Sarbadhikary ir kt., 2021). Tai tik keletas pavyzdžių, šiuo metu klinikoje taikoma ir daugiau FS (Gunaydin ir kt., 2021; Sarbadhikary ir kt., 2021).

Siekiant išvengti porfirinų tipo FS trūkumų, šiuo metu siekiama sukurti trečios kartos FS. Trečiosios kartos FS galėtų būti antrosios kartos FS dariniai, gaunami sujungiant juos su biomolekulėmis, padedančiomis FS selektyviai pasiekti taikinius navikiniame audinyje. Kiekvieno audinio ląstelės pasižymi tik joms būdingais membranais antigenais, navikinio audinio ląstelės – taip pat. Žinant kokius antigenus būdingi konkrečiai naviko atveju, galima prie FS molekulės prijungti ligandus, tokius kaip folio rūgštis arba transferinas, ar antikūnus, kurie prisijungtų prie specifinių antigenų (4 pav.). Tokiu atveju FS susikauptų selektyviai tikslinėse ląstelėse (Gierlich ir kt., 2020).

Tyrimų ir medicinos sritis, kurioje naudojami FS, sujungti su antikūnais, vadinama imunofototerapija. Vienas pirmųjų bandymų pritaikyti FS su prijungtu antikūnu vėžio gydymui, aprašytas 1992 m. Schmidt ir kt. publikacijoje, kurioje ftalocianinas su prijungtu antikūnu buvo sėkmingai panaudotas trijų pacientų, sergančių pažengusia kiaušidžių karcinoma gydymui (Gunaydin ir kt., 2021). Nuo to laiko šiose srityje atlikta nemažai tyrimų (Sandland ir Boyle, 2019; Gierlich ir kt., 2020). Vienas iš perspektyviausių pavyzdžių yra vandenyje tirpus silicio dioksido ftalocianino pagrindu pagamintas dažas IRDye700DX, kuris buvo konjuguotas su skirtingais monokloniniais antikūnais (Gierlich ir kt., 2020). Mokslininkų darbai parodė, kad ši strategija gali būti veiksminga gydant

skirtingos kilmės navikus, naudojant antikūnus prieš atitinkamus taikinius, pavyzdžiui, prostatos vėžį, burnos vėžį, plaučių vėžį, glioblastomą ir melanomą. Apskritai toks konjugatas gali sukelti specifinę vėžio ląstelių mirtį FNT metu, tuo pačiu tausodamas gretimus sveikus audinius, naviko kraujagysles ir infiltruojančias imunines ląsteles (Gierlich ir kt., 2020).



4 pav. Principinė schema, vaizduojanti fotosensibilizatorių prijungimą prie antikūno. Adaptuota pagal Sandland ir Boyle, 2019.

Ilgą laiką didžiausia problema buvo tai, kad prie FS prijungus antikūnus, kurie yra sąlyginai didelės molekulės, dingsta FS optinės ir fotosensibilizacinės savybės (van Dongen ir kt., 2004). Idealiu atveju porfirinas su antikūnu jungtųsi tik per vieną funkcinę grupę, reakcija turėtų vykti be kaitinimo, konjugatai turėtų susidaryti homogeniškai (Sandland ir Boyle, 2019). Tokias savybes pasiekti nėra lengva, tad ieškoma ir kitų alternatyvių būdų pagerinti FS selektyvumą vėžinėms ląstelėms. Dėl šių priežasčių mokslininkų akys krypsta ir į kitas sritis, galinčias pagerinti FNT efektyvumą, viena jų – nanotechnologijos. Trečios kartos FS galėtų būti fotoluminescuojančios nanodalelės, kurios pasižymi fotosensibilizacinėmis savybėmis. Nanodaleles lengva modifikuoti antikūnais, neprarandant jų savybių, o prijungus antikūnus galima jas kryptingai nukreipti į naviką. Tokiu būdu būtų pagerintas selektyvumas ir sumažinti šalutiniai poveikiai.

2.3. Fluorescencinė diagnostika

Ankstyvas naviko ribų nustatymas ir tolesnis stebėjimas gydymo metu yra ne mažiau svarbūs geresnei paciento priežiūrai ir greitesniam sveikimui. Fluorescencinis tyrimas yra greitas, jautrus, saugus ir pigus diagnostinis metodas (Tipirneni ir kt., 2017).

Fluorescencinė diagnostika – tai diagnostikos rūšis, kurios metu yra naudojama šviesa ir optiniai vaizdinimo metodai audinių fluorescencijai registruoti. Fluorescencinė diagnostika apima daugybę diagnostikos rūšių, galimų taikyti įvairiems tikslams, kurių svarbiausieji yra: diagnozuoti ligą, nustatyti tikslią vietą, iš kur imti mėginį, ir matuoti fiziologinius parametrus. Fluorescencinė diagnostika yra skirstoma į nesensibilizuotą ir sensibilizuotą (Rotomskis ir Streckytė, 2007).

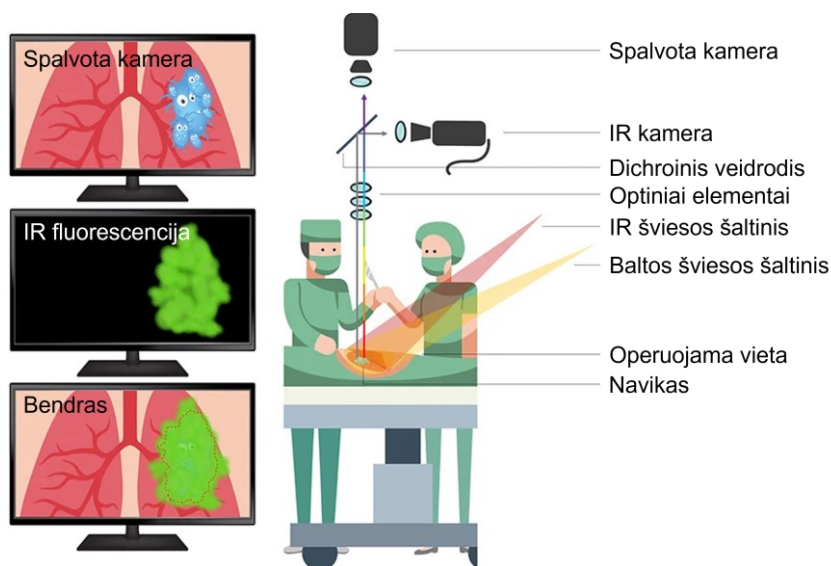
Nesensibilizuotoji fluorescencinė diagnostika pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų skleidžiama fluorescencija, dar vadinama savitąja audinių fluorescencija. Sveikų audinių ir pakitusių audinių savitoji fluorescencija skiriasi dėl ląstelėse pasikeitusių metabolinių procesų. Kadangi vėžinėse ląstelėse kokybiškai ir kiekybiškai kinta ir endogeninių fluoroforų kiekis ir sudėtis, lyginant su sveikomis ląstelėmis, registruojant audinių savitosios fluorescencijos spektrus, galima nustatyti pakitusius audinius. Tačiau savitosios fluorescencijos signalas yra menkas, todėl kyla sunkumų ją registruojant ir vėliau analizuojant, dėl to šis metodas klinikinėje praktikoje taikomas retai. Siekiant pagerinti fluorescencinės diagnostikos galimybes, naudojami papildomi fluorescenciniai dažai (fluoroforai), paryškinantys naviką (Rotomskis ir Streckytė, 2007).

Onkologinių ligų fluorescencinei diagnostikai gali būti naudojamos medžiagos, kurios ląstelių metabolizmo metu paverčiamos į endogeninius fluoroforus, arba egzogeniniai fluoroforai, kurie linkę kauptis vėžinėse ląstelėse. Vienas dažniausiai naudojamų endogeninių fluoroforų yra PpIX. Suleidus į organizmą 5-ALA, hemo sintezės ciklo reakcijos suaktyvėja. Jei ląstelėje yra 5-ALA perteklius, fermentai nebespėja atlikti sintezės ir pradeda kauptis tarpiniai produktai, tokie kaip PpIX, kurio fluorescenciją galima užfiksuoti. Be to, jei ląstelėse dėl pakitimų hemo sintezės ciklas yra sutrikęs, pasikeičia ir tarpinių produktų kiekiai ląstelėse. Dėl to pasikeičia ir audinių fluorescencija. Naudojant šį metodą galima diagnozuoti ankstyvųjų stadijų navikus, taip pat ikinavikinius audinių pakitimus (Ishizuka ir kt., 2011). Šiuo metu 5-ALA ir jos dariniai klinikinėje fluorescencinėje diagnostikoje naudojama dermatologijos, pulmonologijos, urologijos, ginekologijos, gastroenterologijos, neurologijos srityse (Casas, 2020).

Siekiant geresnio sveikų ir pakitusių audinių fluorescencijos kontrasto, į organizmą gali būti suleidžiami egzogeniniai fluoroforai, dažniausiai tie patys FS kaip ir FNT. Tačiau šiuo atveju fotosensibilizacinis poveikis yra nepageidaujamas, kad nebūtų pažeidžiami audiniai. Todėl diagnostikos metu yra naudojamos daug mažesnės fotosensibilizatorių ir švitinimo dozės nei FNT metu arba parenkami tokie FS, kurie prastai generuoja 1O_2 . Procedūros metu FS suleidžiamas į organizmą arba taikomas išoriškai. Po kelių ar

keliolikos valandų FS susikaupia pažeistuose audiniuose. Sužadinus tinkamo bangos ilgio šviesa stebima FS fluorescencija. Navikiniame audinyje susikaupia daugiau FS, todėl stebima ryškesnė fluorescencija. Tokiu būdu galima nustatyti naviko ribas (Rotomskis ir Streckytė, 2007; Zheng ir kt., 2019; Lauwerends ir kt., 2021).

Klinikinėje praktikoje fluorescencinė diagnostika dažniausiai naudojama naviko ribų nustatymui operacijos metu (5 pav.). Dažniausiai naudojami FS yra indocianino žaliasis, metileno mėlis, fluoresceino natrio druska ir 5-ALA (Zheng ir kt., 2019). Indocianino žaliasis šiuo metu yra plačiausiai naudojamas fluoroforas naviko ribų nustatymui operacijos metu (klinikiniuose tyrimuose apie 60 % visų tyrimų) (Nagaya ir kt., 2017). Indocianino žaliasis yra vandenyje tirpus fluoroforas, sužadinamas artimąja infraraudonąja šviesa ties 780 nm ir fluorescuojantis ties 820 nm. Šiame diapazone nėra audinių savitosios fluorescencijos, dėl to dažo susikaupimą lengviau nustatyti. Be to indocianino žaliasis retai sukelia alergines reakcijas ir laikomas saugiu preparatu naudojimui medicinoje (Zheng ir kt., 2019). Klinikoje indocianino žaliasis naudojamas kepenų navikų ribų nustatymui operacijos metu (Purich ir kt., 2020). Metileno mėlis ir fluoresceino natrio druska operacijų metu naudojami daug rečiau (Zheng ir kt., 2019). Tačiau fluoresceino natrio druska yra plačiai naudojama oftalmologijoje akies dugno kraujagyslių tyrimuose (fluoresceino angiografija) (Baddam ir kt., 2023).

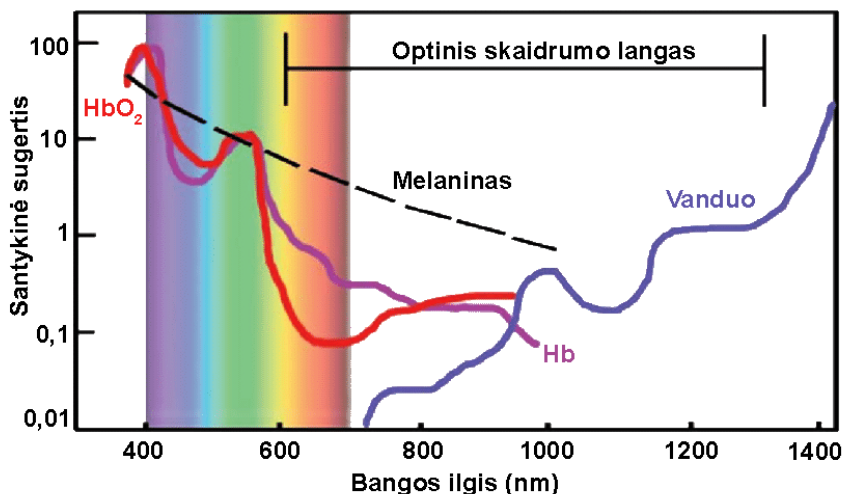


5 pav. Fluorescencinė diagnostika naviko ribų nustatymui operacijos metu. Spalvota kamera yra fiksuojamas bendras operuojamos vietos vaizdas. Panaudojus fluorescencinį dažą (pavyzdžiui, indocianino žaliąjį, kuris šviečia IR srityje), gaunamas naviko fluorescencinis vaizdas. Šiuo metodu galima tiksliau nustatyti naviko ribas ir pašalinti naviką operacijos metu. Adaptuota pagal Borlan ir kt., 2021.

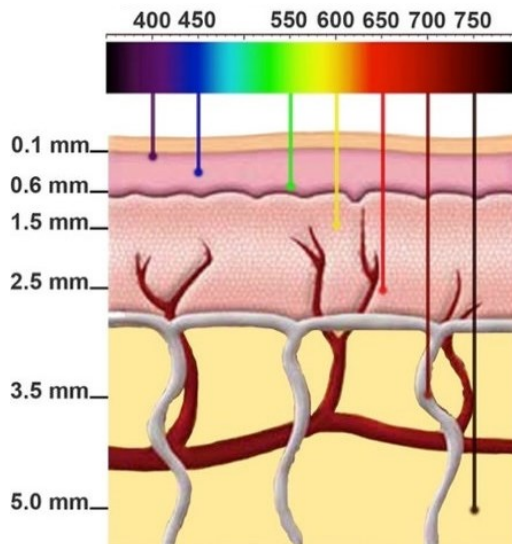
Kaip ir FNT metu, taip ir fluorescencinės diagnostikos metu susiduriama su tomis pačiomis problemomis: FS kaupimasis navikiniame audinyje nėra pakankamai selektyvus (Sarbadhikary ir kt., 2021). Nanodalelės yra tiriamos kaip fluoroforų nešiklis, galintis padėti išvengti difuzinio fluorescencinio dažo pasiskirstymo visame organizme (Egloff-Juras ir kt., 2019; Borlan ir kt., 2021). Kita vertus pačios nanodalelės yra tiriamos kaip potencialūs fluorescenciniai žymenys (McHugh ir kt., 2018; Luo ir kt., 2021). Pastaruoju metu ypač daug dėmesio skiriama nanodalelėms, kurios yra sužadinamos ir fotoluminescuoja artimojoje infraraudonojoje srityje, t. y. audinių optiniame skaidrumo lange (Ong ir kt., 2021; Wang ir kt., 2021; Wang ir kt., 2021)

2.4. Audinių optinio skaidrumo langas

Taikant fluorescencinę diagnostiką ir FNT, labai svarbu atsižvelgti į audinių pralaidumą šviesai. Audiniuose ultravioletinę (UV) šviesą sugeria baltymai, nukleorūgštys ir kitos biomolekulės, šviesą regimojoje srityje daugiausiai sugeria chromoforai – hemoglobinas, melaninas, o infraraudonojoje srityje – vanduo (6 pav.) (Lyons ir kt., 2013). Dėl audinių sugerties regimoji šviesa labai negiliai gali prasiskverbti į audinius. Ilgesnių bangų šviesa (nuo 650 nm) yra mažiau sugeriama audinių, dėl sumažėjusios hemoglobino ir melanino sugerties. Nuo 1300 nm ženkliai išauga vandens sugertis, taigi sumažėja ir šviesos prasiskverbimas. Silpniausiai audinių komponentų sugeriama šviesos sritis yra nuo 650 nm iki 1300 nm, ji vadinama „audinių optinio skaidrumo langu“.



6 pav. Optinis audinių skaidrumo langas – elektromagnetinių bangų spektro sritis, kur sumažėja audinių sugertis. HbO₂ – oksihemoglobinas, Hb – deoksihemoglobinas. Adaptuota pagal Lyons ir kt., 2013.



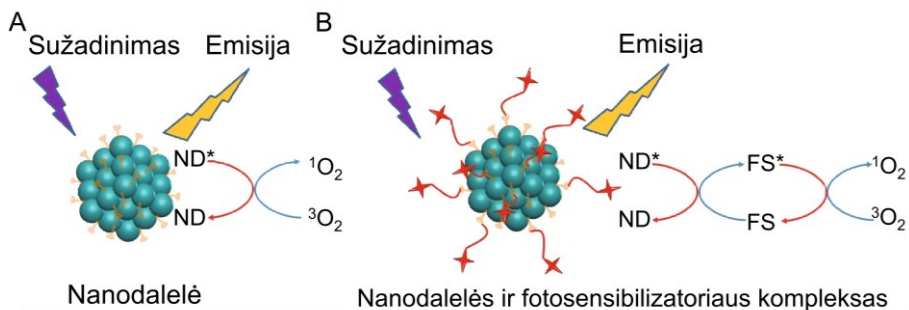
7 pav. Skirtingo bangos ilgio šviesos prasiskverbimo gylio į odą palyginimas. Adaptuota pagal Wang ir kt., 2015.

Kadangi skirtingo bangos ilgio šviesa nevienodai sugeriama audiniuose, pasiskverbimo gylis į audinius taip pat priklauso nuo naudojamos šviesos bangos ilgio (7 pav.). Daugumai molekulių FS sužadinti reikalinga UV arba mėlyna šviesa, kuri mažiausiai prasiskverbia į audinius (apie 0,1 mm). Didinant bangos ilgį šviesos prasiskverbimo gylis didėja, kadangi mažėja hemoglobino ir melanino sugertis (6 pav.). Raudonos šviesos prasiskverbimas ženkliai padidėja lyginant su žalia ar mėlyna šviesa (7 pav.). Pavyzdžiui, 650 nm spinduliuotė gali prasiskverbti iki 2,5 mm, 700 nm – jau iki 3,5 mm, o 750 nm iki 5 mm (Wang ir kt., 2015). Dėl to buvo dedama daug pastangų kuriant FS, kurių sugertis būtų kuo labiau paslinkta į raudoną pusę. Antros kartos FS turi intensyviai Q1 juostas raudonoje srityje bei pasižymi fluorescencija, patenkančia į audinių optinio skaidrumo langą (Sarbadhikary ir kt., 2021). Tačiau praktikoje, kelių milimetrų šviesos skvarba yra pakankama tik paviršinių navikų diagnostikai ar terapijai. Todėl siekiama kurti tokius FS, kurie būtų optiškai aktyvūs IR srityje. Chen ir kt. parodė, kad 980 nm spinduliuotė gali prasiskverbti 3,2 cm į audinį (Chen ir kt., 2012). Tuo tarpu kitoje publikacijoje Hudson ir kt. parodė, kad 980 nm spinduliuotė prasiskverbia 2,2 cm (į audinį šviečiant 1 W/cm^2 , 2,2 cm gylyje fiksuojama 1 mW/cm^2) (Hudson ir kt., 2013). Publikacijos autoriai taip pat parodė, kad tokio paties galio tankio 808 nm lazerio spinduliuotė prasiskverbia iki 3,4 cm (Hudson ir kt., 2013). Padidinus žadinančios šviesos skvarbą nuo kelių mm iki kelių cm, būtų galima pasiekti daugiau navikų ir praplėsti fluorescencinės diagnostikos bei FNT panaudojimo ribas. Tačiau tokio bangos ilgio šviesa jau

turi nepakankamai energijos inicijuoti fotosensibilizacinės reakcijos. Norint pasiekti gilesnius audinių sluoksnius neprarandant energijos, reikėtų „antenas“ kuri sugertų žemos energijos šviesą ir išspinduliuotų didesnės energijos šviesą, tinkamą FS sužadimui. Tokia antena galėtų būti AKND, kurios aptariamose tolimesniuose skyriuose.

2.5. Nanotechnologijos vėžio teranostikai

Pastaraisiais metais daug dėmesio skiriama fotoluminescuojančioms nanomedžiagoms, kurios kartu pasižymi ir fotosensibilizacinėmis savybėmis bei jų tyrimams (8 pav. A). Tikimasi, kad tokios nanomedžiagos padės įveikti klasikinių fotosensibilizatorių trūkumus, tokius kaip ribotas tirpumas vandenyje, prastas fotostabilumas ir dėl agregacijos mažėjantis aktyvių deguonies formų generavimo efektyvumas (Tavakkoli Yaraki ir kt., 2022).



8 pav. A – nanodalelė, po sužadavimo emituojanti šviesą ir generuojanti $^1\text{O}_2$. B – nanodalelės ir fotosensibilizatoriaus kompleksas kaip daugiavonkė nanomedžiaga, skirta vienu metu fluorescenciniam vaizdinimui ir fotodinaminei terapijai. ND veikia kaip donoras, o FS – kaip akceptorius energijos pernašoje. Adaptuota iš Tavakkoli Yaraki ir kt., 2022.

Idėja panaudoti fotoluminescuojančias nanodaleles kaip fotosensibilizatorius kilo 2003 m., kai Samia ir kt. parodė, kad CdSe kvantiniai taškai generuoja ROS esant 488 nm sužadimui; tačiau $^1\text{O}_2$ generacijos kvantinis našumas buvo mažesnis nei 5 %, todėl negalėjo konkuruoti su porfirinų tipo FS efektyvumu (Samia ir kt., 2003). TiO_2 ir ZnO nanodalelės taip pat buvo tiriamos kaip FS. Buvo parodyta, kad ląstelių, inkubuotų su TiO_2 ir ZnO nanodalelėmis ir apšvitintų UV šviesa, gyvybingumas sumažėjo (Zhang ir kt., 2014). Kitoje publikacijoje buvo parodyta, kad porėto silicio nanodalelės gali būti panaudotos kaip FS. Šių nanodalelių $^1\text{O}_2$ susidarymo kvantinis našumas vandenyje buvo 17 %, to pakako sukelti citotoksinį poveikį HeLa ir NIH3T3 ląstelėms (Xiao ir kt., 2011). Citratu stabilizuotos sferinės aukso nanodalelės (Au ND) (15 ir 46 nm skersmens) generuoja $^1\text{O}_2$, kai yra švitinamos šviesos bangos ilgiu plazmonų

rezonanso juostoje, tačiau jų kvantinis našumas mažas (Chadwick ir kt., 2016). Au NK taip pat tiriami kaip perspektyvus FS, pavyzdžiui, glutationu padengti Au NK efektyviai generuoja $^1\text{O}_2$, kai yra švitinami 800 nm impulsiniu lazeriu (Ho-Wu ir kt., 2017). Lyginant su įprastais fotosensibilizatoriais, metalų nanoklasteriai pasižymi puikiu ROS generavimo efektyvumu, geru tirpumu vandenyje ir puikiu fotostabilumu, todėl turi didelį potencialą kaip naujos kartos nano-fotosensibilizatoriai, skirti FNT taikymams (Tavakkoli Yarakı ir kt., 2022). Apskritai, Au NK taikymas vėžio gydymui sulaukė daug dėmesio (Cifuentes-Rius ir kt., 2021) ne tik FNT, bet ir fototerminiai terapijai (Higbee-Dempsey ir kt., 2019; Jiang ir kt., 2020), radioterapijai (Kefayat ir kt., 2019; Samani ir kt., 2020) ir chemoterapijai, kai Au NK panaudojamas kaip priešvėžinių vaistų nešiklis (Govindaraju ir kt., 2019; Latorre ir kt., 2019).

Nors pastaraisiais metais Au NK tyrimuose padaryta daug žadanti pažanga, reikėtų paminėti, kad mėlyną ir raudoną šviesą fotoluminescuojantys Au NK gali būti nepraktiški kaip fluorescenciniai žymekliai klinikinėje diagnostikoje, kadangi jų sužadanimui naudojama trumpabangė šviesa santykinai mažai prasiskverbia į audinius.

FNT trūkumus galima pašalinti ne tik ieškant nanodalelių, kurios atliktų FS funkciją, bet ir sukūrus nanodalelių ir fotosensibilizatorių kompleksus (ND-FS) (8 pav. B). Tokiu atveju sužadinta nanodalelė (ND) dalį energijos perduoda FS, kuris dalyvauja $^1\text{O}_2$ susidarymo reakcijose. Tokie ND-FS laikomi teranostinėmis nanomedžiagomis, kadangi ND atlieka diagnostinę funkciją, o FS terapiją.

Nemažai tyrimų buvo atlikta su kvantinių taškų ir Ce_6 kompleksais. 2011 m. buvo pademonstruota, kad Ce_6 jungiasi prie CdSe/ZnS kvantinių taškų padengtų lipidiniu apvalkalu su išorinėmis karboksi- grupėmis, sudarydami stabilų kompleksą, kuriame energija pernešama iš kvantinio taško į FS (Valančiūnaitė ir kt., 2011). Vėlesni tyrimai parodė, kad tokie kompleksai kaupiasi žmogaus kasos vėžinėse ląstelėse ir gali būti naudojami fototoksiniam poveikiui vėžinėms ląstelėms sukelti (Steponkiene ir kt., 2014). Galiausiai atlikus tyrimus su pelėmis, buvo pademonstruota, kad ši sistema gali būti panaudota vėžio diagnostikai ir terapijai *in vivo* (Dapkute ir kt., 2021). CdSe/ZnS kvantinių taškų ir Ce_6 kompleksų tyrimai ženkliai prisidėjo prie fundamentinio proceso ištyrimo, tačiau praktinis pritaikymas onkologijoje kol kas mažai tikėtinas dėl dviejų priežasčių. Visų pirma, kvantinių taškų sudėtyje esantis Cd yra sunkusis metalas, tad jei kvantinis taškas organizme suirtų, galimai sukeltų toksinį poveikį visam organizmui. Kita problema – kvantinių taškų sužadanimui naudojama regimoji šviesa yra nepakankamai skvarbi audiniuose.

Pastaraisiais metais nemažai dėmesio mokslinėje literatūroje skiriama nanomedžiagų, kurios būtų optiškai aktyvios IR srityje, paieškai. Anksčiau minėti kvantiniai taškai (Skripka ir kt., 2021) ir aukso nanoklasteriai (Li ir kt., 2021) taip pat gali pasižymėti liuminescencija IR srityje, priklausomai nuo sudėties ir sintezės sąlygų. Tokios nanodalelės gali būti pritaikomos optiniam navikų vaizdinimui realiu laiku. Tačiau liuminescencija IR srityje netinka FS sužaditimui, taigi naudojant minėtas nanodaleles nepavyktų sudaryti teranostinių kompleksų. Idealus sprendimas būtų turėti vietinę anteną, galinčią IR šviesą paversti į didesnės energijos regimąją arba UV šviesą. Tokios antenos FS sužaditimui gali būti retųjų žemių metalais legiruotos apkonvertuojančios nanodalelės. Šias nanodaleles galima sužadinti 980 nm spinduliuote, tačiau jos pasižymi emisija regimojoje spektro dalyje. Taigi emituotą UV spinduliuotę galima panaudoti FS sužaditimui, o raudoną – diagnostikai.

Toliau detaliau nagrinėjami aukso nanoklasteriai ir retaisiais žemių metalais legiruotos nanodalelės, aptariamoms jų savybės, privalumai bei trūkumai.

2.5.1. Baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai

Aukso nanoklasteriai yra itin maži klasteriai nuo kelių iki 100 aukso atomų, kurių bendras skersmuo mažesnis nei 2 nm. Priešingai nei aukso nanodalelės, kurių skersmuo didesnis nei 2 nm, Au NK, kurių dydis yra artimas elektrono Fermi bangos ilgiui (~0,5 nm auksui), turi diskrečius elektronų lygmenis ir savo optinėmis savybėmis tampa panašūs į fluorescuojančias molekules. Atsižvelgiant į tai, kad Au NK fotoluminescuoja artimajame infraraudonųjų spindulių diapazone nuo 650 nm iki 900 nm, t. y. audinių optinio skaidrumo lange, jie yra ypač patrauklūs vėžio diagnostikai. Be to, Au NK paprastai yra biologiškai suderinami, stabilesni nei organiniai fluorescenciniai dažai, turi didelį Stokso poslinkį ir ilgą fluorescencijos gyvavimo laiką. Keičiant Au NK sintezėje naudojamus klasterį stabilizuojančius ligandus, galima išgauti skirtingo dydžio ir įvairiais bangos ilgiais fotoluminescuojančius Au NK (van de Looij ir kt., 2022).

2009 m. J. Xie su kolegomis pirmieji susintetino ir aprašė aukso ir jaučio serumo albumino nanoklasterius (JSA-Au NK) (Xie ir kt., 2009). Šių nanodalelių aukso klasteris sudarytas iš 25 atomų, todėl yra priskiriamas itin mažoms aukso nanodalelėms. Jaučio serumo albumino funkcija organizme yra palaikyti pastovų kraujo pH ir osmosinį slėgį, pernešti įvairias medžiagas. Šis baltymas pasižymi specifinių ligandų prisijungimu (dėl atliekamos pernašos funkcijos), dėl to yra tiriamas kaip galimas vaistų nešiklis. Be to,

JSA lengvai išskiriamas ir pigus, jis yra stabilus, dėl to su juo lengva dirbti. Dėl šių priežasčių daugybė mokslininkų naudoja JSA kurdami baltymines sistemas (P. Khullar, 2012). JSA-Au NK pasižymi fotoluminescencija raudonoje spektro dalyje ir patenka į audinių optinio skaidrumo langą (650 – 1300 nm). Dėl to galima neinvaziniais optiniais metodais stebėti nanodaleles organizme. Tai leistų stebėti vaisto nešiklio judėjimą nuo suleidimo vietos iki, pavyzdžiui, naviko. Be to, Au NK būtų galima naudoti kaip fotoluminescuojančius biožymenis vėžio diagnostikoje.

Baltymais stabilizuotų Au NK sintezė yra laikoma žaliaja biosinteze, nes sintezės metu nenaudojamos pavojingos cheminės medžiagos. Au NK biosintezę galima atlikti ir gyvuose organizmuose arba biologinės kilmės terpėse. Wang ir kt. įrodė, kad vėžio ląstelės gali spontaniškai susintetinti Au NK (Wang ir kt., 2013). Li ir kt. parodė, kad Au NK biosintezė yra įmanoma biologinėse terpėse, tokiose kaip kiaušinio baltymas ir trynys, jaučio embriono, pelės ar žmogaus kraujo serume (Li ir kt., 2015). Tokiu būdu susintetinti Au NK pasižymi fotoluminescencija (FL) raudonojoje 633-663 nm bangos ilgių srityje, kai yra sužadinami 470 nm bangos ilgio šviesa. Nors sintezei buvo naudotos terpės turinčios skirtingą baltymų sudėtį, susintetintų Au NK spektrinės savybės buvo artimos JSA-Au NK spektrinėms savybėms, tad autoriai padarė išvadą, kad albuminai atlieka pagrindinį vaidmenį Au NK formavime sintezės metu (Li ir kt., 2015; Xie ir kt., 2009). Vėliau buvo aprašyta Au NK biosintezė bakterijų, augalų ir grybų ekstraktuose (Ahmed ir kt., 2016; Tepale ir kt., 2019).

Biologinis suderinamumas ir organizmo atsakas į nanodaleles visada buvo vienas svarbiausių aspektų svarstant nanodalelių pritaikymą klinikoje, todėl netoksiškų nanomedžiagų paieška yra svarbi kuriant teranostinius nanovaistus. Auksas yra vienas iš labiausiai biologiškai suderinamų metalų, naudojamų įvairiems medicinos prietaisams ir implantams (Demann ir kt., 2005; Syburra ir kt., 2010); todėl tikimasi, kad aukso nanodalelės bus netoksiškos ir tinkamos biologiniam pritaikymui. Dėl itin mažo dydžio (<2 nm) ir lengvo modifikavimo biomolekulėmis, Au NK yra laikomi ypač biosuderinami. Kaip jau minėta, Au NK stabilizavimui pirmiausiai buvo panaudotas JSA, tačiau šiuo metu yra nemažai publikacijų, kuriose Au NK sintezei naudojami įvairūs kiti baltymai, tokie kaip lizocimas (Wei ir kt., 2010; Chen ir Tseng, 2012), tripsinas (Kawasaki ir kt., 2011; Dixon ir Egusa, 2021), ovalbuminas (Dixon ir Egusa, 2021), galvijų (Liu ir kt., 2011; Dixon ir Egusa, 2021) ir žmogaus (Ar ir kt., 2013) insulinas, žmogaus serumo albuminas (ŽSA) (Peralta ir kt., 2014; Russell ir kt., 2016; Chakraborty ir kt., 2021), taip pat kraujo plazmos baltymai, tokie kaip fibrinogenas (Suo ir kt., 2019) arba transferinas (Xavier ir kt., 2010; Le Guével ir kt., 2011) ir kiti (El-Sayed ir

Schneider, 2020). Anksčiau minėtas ŽSA yra ypač įdomus, nes jis yra gausiausias baltymas žmogaus plazmoje ir sudaro maždaug 60 % visų plazmos baltymų. ŽSA fiziologinė koncentracija kraujo plazmoje yra 35-50 g/l, o kitų baltymų, tokių kaip imunoglobulinai, fibrinogenas ir transferinas, koncentracijos yra daug mažesnės (Kratz ir Elsadek, 2012). Kadangi yra žinoma, kad Au NK galima stabilizuoti atskirais kraujo plazmos baltymais, tikėtina, kad biosintezę galima atlikti ir tiesiog kraujo plazmoje. Taigi Au NK būtų galima sintetinti individualiai kiekvieno paciento kraujo plazmoje, tokiu būdu personalizuojant nanovaistus vėžio diagnostikai ir gydymui bei maksimaliai sumažinant galimą šalutinį poveikį.

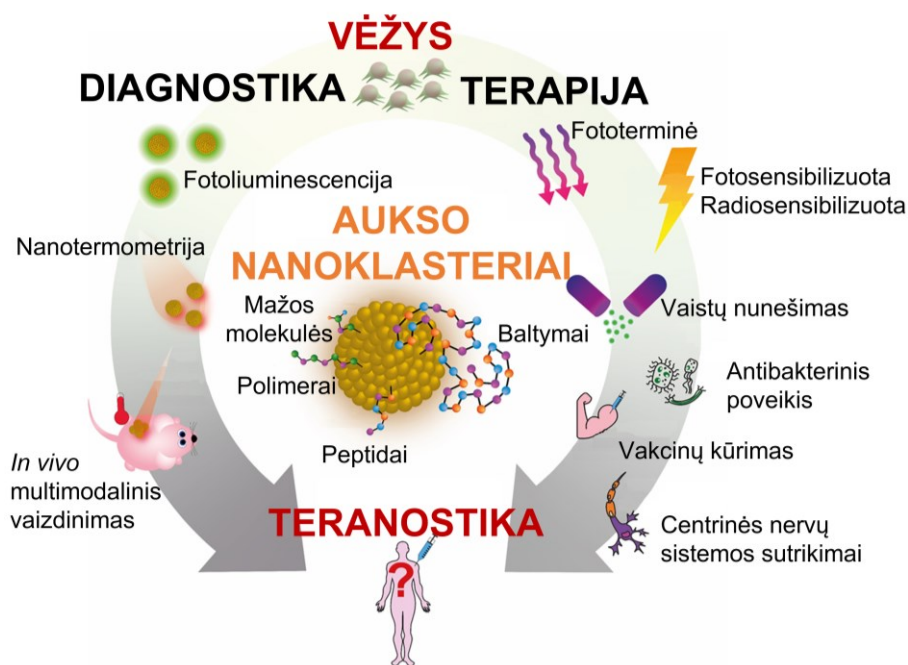
2.5.2. Aukso nanoklasterių pritaikymas vėžio teranostikai

Au NK pritaikymas medicinoje gali būti ganėtinai platus. Au NK nagrinėjami kaip galimi vaizdinimo žymenys, tiek fluorescencinėje diagnostikoje, tiek kompiuterinėje tomografijoje (Zhang ir kt., 2012), prijungus papildomų ligandų – magnetinio rezonanso vaizdinimui (Han ir kt., 2017; Xu ir kt., 2017) ar pozitronų emisijos tomografijai (Han ir kt., 2020; Zheng ir kt., 2021). Au NK taip pat gali būti pritaikyti ir multimodaliniam vaizdinimui, t. y. būti panaudoti keliems vaizdinimo metodams (He ir kt., 2020; Zhang ir kt., 2022). Tai pat Au NK gali būti panaudoti FNT, fototerminiai terapijai, tiksliai vaistų nunešimui (van de Looij ir kt., 2022). Au NK gali būti naudojami ne tik vėžio gydymui, tačiau tiriami kaip priemonė prieš antibiotikams atsparias bakterijas, naudojami vakcinų kūrime, nagrinėjami kaip vaisto nešiklis centrinės nervų sistemos sutrikimams gydyti (van de Looij ir kt., 2022). Apjungus dvi ar daugiau Au NK panaudojimo galimybes, galima sukurti teranostinę platformą (9 pav.). Nors daugumoje publikacijų tiriama viena Au NK funkcija, ši nanomedžiaga ypatinga tuo, kad net be papildomų modifikacijų yra tinkama kelioms funkcijoms atlikti. Pastaraisiais metais pasirodė keletas publikacijų, kuriose baltymais stabilizuoti Au NK nagrinėjami kaip teranostinė platforma vėžio diagnostikai ir gydymui (van de Looij ir kt., 2022).

Au NK gali būti naudojami kaip diagnostinis žymeklis ir chemoterapijų vaistų nešiklis. Pavyzdžiui, Khandelia ir kt. tyrė JSA-Au NK kaip vaisto nešiklį priešvėžinio vaisto doksorubicino pernešimui ir kartu kaip kontrastinę medžiagą vienfotonio arba dvifotonio sužadavimo vėžinių ląstelių vaizdinime (Khandelia ir kt., 2015). Naudojant dvifotonį žadinimą galima atlikti vaizdinimą IR srityje. Taip pat buvo nustatyta, kad vieni JSA-Au NK nepasižymi citotoksiškumu. Tačiau juos konjugavus su doksorubicinu buvo nustatyta, kad vėžinėse ląstelėse doksorubicinas yra atpalaiduojamas ir sukelia

toksiškumą, tiesa mažesni, nei laisvas doksorubicinas. Tai gali būti paaiškinta nepilnu doksorubicino išsiskyrimu per 36 val. inkubacijos laiką (Khandelia ir kt., 2015).

Zhou ir kt. tyrime cisplatina, konjuguota su folio rūgštimi, naudojama kaip provaistas JSA-Au NK funkcionalizavimui (Zhou ir kt., 2016). Šios chemoterapijos vaistų išleidimas buvo pagrįstas redukcijos-oksidacijos reakcijoms jautriu jungikliu, kuris sujungė cisplatiną su JSA-Au NK. Straipsnio autoriai taip pat parodė JSA-Au NK fluorescencinį vaizdinimą ir biologinį pasiskirstymą *in vivo*. Aptariamoje publikacijoje JSA-Au NK efektyviai ir specifiskai susikaupė navike, slopindami navikų augimą ir metastazes plaučiuose, minimaliai kaupdamiesi sveikuose organuose (Zhou ir kt., 2016).



9 pav. Au NK, padengtų įvairiais stabilizuojančiais ligandais, pritaikymas diagnostikai ir terapijai. Adaptuota pagal van de Looij ir kt., 2022.

Han ir kt. pasirinko kitą strategiją teranostinei sistemai sukurti: JSA stabilizuotas gadolinio oksido ir aukso nanoklaserių hibridas sukurtas kaip multimodalinis vaizdinimo žymuo ir fotosensibilizatoriaus indocianino žaliojo nešiklis (Han ir kt., 2017). Nanohibridas pasižymi biologiniu suderinamumu ir gali padidinti magnetinio rezonanso ir rentgeno kompiuterinės tomografijos kontrastą. Tuo tarpu integruotas Au NK ne tik suteikia nanohibridui raudoną fluorescenciją, bet ir skatina $^1\text{O}_2$ susidarymą švitinant 808 nm lazerio spinduliuote. Indocianinas žaliosis suteikia

nanohibridui IR fluorescencijos vaizdinimo galimybę ir pagerina jo fotosensibilizacines savybes bei fototermines galimybes (Han ir kt., 2017).

Chen ir kt. ištyrė ŽSA-Au NK su prijungtomis katalazės molekulėmis bei jų panaudojimą fluorescencinei diagnostikai ir FNT (Chen ir kt., 2018). Naudojant IR šviesą aktyvavimui (bangos ilgis 1064 nm, švitinimo trukmė 20 min) minėti Au NK veikė kaip FS ir naviko tūris reikšmingai sumažėjo, lyginant su kontrole. Gydytas vien lazerio spinduliuote arba Au NK neturėjo įtakos naviko tūriui (Chen ir kt., 2018).

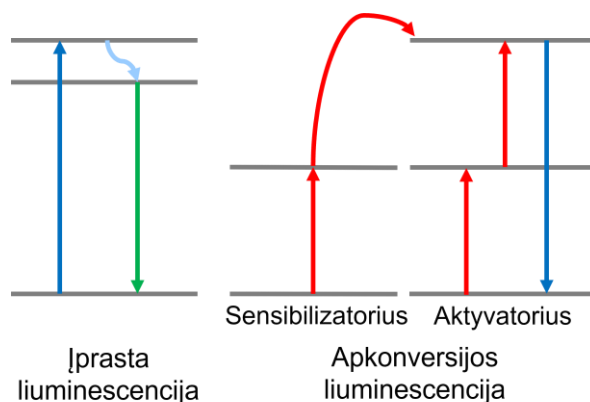
2019 metais Luo ir kt. aprašė cisteino-tirozino-prostatos specifiniais membranais antigenais padengtus Au NK kaip radiosensibilizatorius prostatos vėžio gydymui (Luo ir kt., 2019). Taip pat aprašyti Au NK pasižymėjo fluorescencinėmis savybėmis ($\lambda_{\text{zad}}/\lambda_{\text{FL}} = 490/700$ nm) vaizdinant *in vitro* bei davė kontrastą kompiuterinės tomografijos vaizdinimo metu *in vivo*. Biologinio pasiskirstymo pelėse tyrimų metu buvo pastebėtas greitas Au NK pašalinimas per šlapimo šalinimo organus. *In vivo* tyrimai parodė, kad pelėms, turinčioms prostatos specifinius membranais antigenus ekspresuojančių navikų, naviko augimas buvo slopinamas daug efektyviau, palyginti su šių antigenų neturinčiais navikais po intraveninės injekcijos. Abiem atvejais, praėjus 18 dienų po 6 Gy švitinimo dozės, naviko dydis padidėjo atitinkamai 94 % ir 311 %, palyginti su kontrolinėmis, kurių navikas išaugo iki 430 %. Šie rezultatai rodo, kad Au NK iš tikrųjų veikia kaip radiosensibilizatoriai, o funkcionalizuojant jų paviršius su antikūnais galimas aktyvus nukreipimas į naviką (Luo ir kt., 2019).

Paminėti tik keli pavyzdžiai, kaip baltymais stabilizuotus Au NK galima pritaikyti vėžio teranostikai. Tačiau šiuo metu tyrimų, kuriuose būtų aprašytas Au NK kaip FS panaudojimas FNT be papildomų ligandų prijungimo, nėra. Šiame darbe aprašomi Au NK yra patys paprasčiausi, be papildomų molekulių. Paprastesnė sistema visada yra labiau pageidaujama, siekiant pagreitinti ir supaprastinti sintezės procedūrą, padaryti naujos kartos preparatus labiau prieinamus pacientui.

2.5.3. Retųjų žemių metalų nanodalelės

Apkonversija yra netiesinės optikos procesas, kurio metu du ar daugiau mažesnės energijos fotonų yra sugeriami, o išspinduliuojamas vienas aukštesnės energijos fotonas. Apkonversijos procesui yra būdingas anti-Stokso poslinkis: liuminescencijos spektras ir jo smailė yra pasislinkę sugerties spektro atžvilgiu į trumpabangę pusę. Dėl apkonversijos proceso, medžiagą galima sužadinti infraraudonąją spinduliuote ir registruoti

liuminescenciją regimojoje ar netgi UV srityje (Liu ir kt., 2013a). Įprastos ir apkonversijos fotoluminescencijos procesų palyginimas yra pateiktas 10 pav.

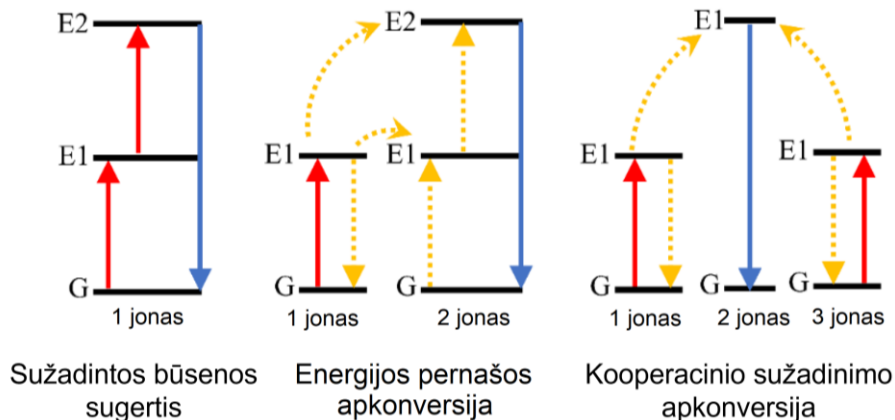


10 pav. Įprastos ir apkonversijos fotoluminescencijų palyginimas. Įprastos fotoluminescencijos atveju sugeriamas vienas didesnės energijos fotonas (mėlynas) ir išspinduliuojamas mažesnės energijos fotonas (žalias). Apkonversijos metu sugeriami keli mažesnės energijos fotonai (raudoni) ir išspinduliuojamas vienas didesnės energijos fotonas (mėlynas).

Dažniausiai apkonversijos procesas stebimas ir yra geriausiai ištirtas medžiagose, kurios savo sudėtyje turi lantanoidų jonų, tačiau pasireiškia ir pereinamųjų elementų sistemose bei retųjų žemių metalų/pereinamųjų elementų kombinuotose medžiagose. Retųjų žemių metalai – tai lantanoidų ir aktinoidų serijos elementai. Gamtoje jie nėra reti, tačiau taip pavadinti istoriškai dėl sunkaus ir ilgo jų oksido gryninimo proceso. Retųjų žemių metalų unikalias savybes nulemia jų nevisiškai užpildyti išoriniai atomų energijos lygmenys. Daugumos cheminių elementų išoriniai, toliausiai nuo branduolio nutolę atomų energijos lygmenys dažniausiai būna tušti. Lantanoidų atveju kai kurie elektronų lygmenys, išsidėstę arčiau branduolio būna neužpildyti elektronais. Pavyzdžiui, lantanas 4f lygmenyje neturi nė vieno elektrono, bet aukštesni lygmenys – 5s, 5p, 6p – yra užpildyti elektronais. Retųjų žemių metalų junginiuose 4f elektronai nedalyvauja cheminių ryšių sudaryme, ryšius sudaro išoriniai 5s ir 6p elektronai. Tokia elektronų lygmenų užpildos konfigūracija smarkiai ekranuoja lantanoidų vidinius lygmenis, todėl retųjų žemių metalų jonuose sugertis ir liuminescencija vyksta ne tik elektronų šuolių iš aukščiausių užpildytų elektronais lygmenų dėka, kaip tai įprasta daugeliui atomų ir molekulių, bet ir dėl vidinių elektronų f-f šuolių (Chen ir kt., 2014).

Apkonvertuojančios nanodalelės (*angl. upconversion nanoparticles*) – tai naujos kartos nanodalelės, kurios sugeria artimąją infraraudoną šviesą, o išspinduliuoja UV ir regimąją spinduliuotę. Apkonvertuojančios nanodalelės

atsirado kaip alternatyva fluorescuojantiems žymenims ir šiuo metu turi didelį potencialą būti pritaikytos šiuolaikiniuose biovaizdinimo ir biodetekcijos metoduose tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo*. Šios nanodalelės turi pranašumų prieš anksčiau naudotus ląstelių dažus, kadangi jas sužadinti šviesa išsiskverbia giliai į audinius, o liuminescencija yra ryški bei intensyvi, be to nereikalauja žadinimo kenksmingais UV spinduliais, yra chemiškai stabilios ir netoksiškos biologinėse sistemose (Chen ir kt., 2014).



11 pav. Trys pagrindiniai žemesnės energijos spinduliuotės konversijos į aukštesnės energijos spinduliuotę mechanizmai. Adaptuota pagal Lu ir kt., 2022.

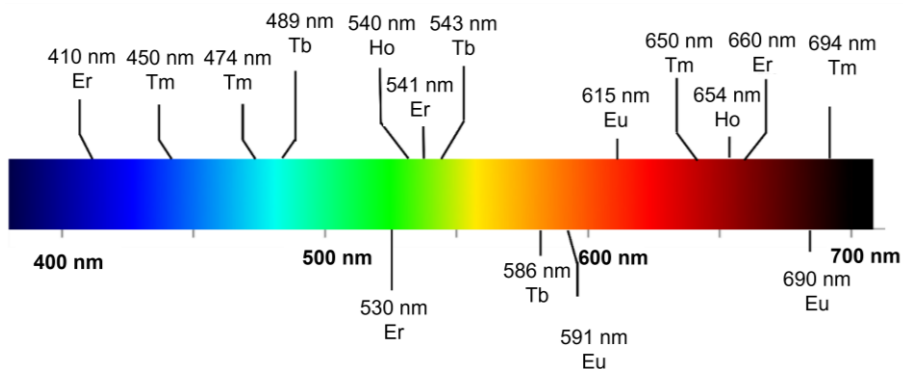
Lantanoidais legiruotos apkonvertuojančios nanostruktūros gali išspinduliuoti didesnės energijos fotonus, sugerdamos du ar daugiau mažesnės energijos sužadavimo fotonus. Išskiriami trys pagrindiniai žemesnės energijos spinduliuotės konversijos į aukštesnės energijos spinduliuotę mechanizmai, t. y. sužadintos būsenos sugerties (*angl. excited state absorption*), energijos pernašos apkonversijos (*angl. energy transfer upconversion*) ir kooperacinio sužadavimo apkonversijos (*angl. cooperative sensitization upconversion*) (11 pav.). Sužadintos būsenos sugerties proceso metu jonas sužadinas pakopiniu būdu, t. y. vyksta elektronų šuoliai iš jo pagrindinės būsenos G (*angl. ground state* – G) į pirmąjį sužadintą lygmenį E1, sugeriant pirmą fotoną; tuomet nuosekliai sugeriant antrą fotoną elektronai peršoka į antrąjį sužadintą energijos lygmenį E2. Jonas negali ilgai užsibūti sužadintoje energijos būsenoje, todėl stengiasi grįžti į pagrindinę būseną, išspinduliuodamas didesnės energijos fotoną. Skirtingai nuo sužadintos būsenos sugerties proceso, kurį sudaro vienas lantanoidų jonas, energijos perdavimo apkonversijos procese dalyvauja du jonai – sensibilizatorius ir aktyvatorius. Pirma, fotonas sužadina 1-ąjį joną (sensibilizatorių) nuo pagrindinės būsenos G iki pirmojo energijos lygmens E1. Tada energija perduodama į 2-ąjį joną (aktyvatorių), o 2-asis jonas pakeliamas iki pirmojo

energijos lygmens E1, o sensibilizatorius grįžta į pradinę būseną G. Šis procesas vyksta antrą kartą, kad aktyvatorius būtų sužadintas į antrąjį energijos lygmenį E2. Aktyvatorius galiausiai išspinduliuoja didesnės energijos fotoną. Kooperacinio sužadavimo apkonversija apima tris jonų centrus, kuriuose 1-asis ir 3-iasis jonai sužadunami iki pirmojo energijos lygmens E1, sugeriant fotoną. Tada jie vienu metu perduoda savo sukauptą energiją 2-jam jonui, sužadindami jį iki antrojo energijos lygmens E2. Didesnės energijos fotonas išspinduliuojamas, kai sužadintas 2-asis jonas grįžta į pradinę būseną G.

Apkonvertuojančios nanodalelės paprastai yra sudarytos iš trijų komponentų: pagrindinės matricos, sensibilizatoriaus ir aktyvatoriaus. Pagrindinė matrica yra optiškai skaidrus kristalas, kuriame yra įterpti sensibilizatorius ir aktyvatorius. Pagrindinė matrica yra parenkama tokia, kad nesugertų šviesos plačiame spektro diapazone, pasižymėtų maža fononų energija, būtų mechaniškai ir chemiškai atspari terpės bei šviesos poveikiui. Už nanodalelėse vykstančią apkonversiją yra atsakingi aktyvatoriai – dažniausiai lantanoidų jonai. Aktyvatoriais nanodalelėse gali būti tie lantanoidai, kurie turi sudėtingas energijos lygmenų diagramas. Sensibilizatoriai yra naudojami nanodalelių emisijos kvantinio našumo pagerinimui. Sensibilizatorius gali būti sužadinas visai kitu bangos ilgiu, nei aktyvatorius. Kaip sensibilizatoriai yra parenkami jonai, turintys paprastą lygmenų diagramą ir galintys sužadavimo energiją perduoti aktyvatoriui. Taigi, sensibilizatorius yra sužadimas spinduliuotės ir perduoda energiją aktyvatoriui, kuris energiją išspinduliuoja šviesos kvanto pavidalu. Aktyvatorius yra apkonvertuojančios nanodalelės liuminescencijos centras, tuo tarpu sensibilizatorius užtikrina apkonversijos liuminescencijos efektyvumą (Chen ir kt., 2014).

Tinkamos pagrindinės matricos parinkimas yra svarbus žingsnis siekiant sukurti kuo didesnio efektyvumo AKND. Netinkamai parinkta pagrindinė matrica lemia nespindulinį energijos praradimą, o kartu ir apkonversijos emisijos efektyvumo sumažėjimą. Tarp daugybės skirtingų apkonvertuojančių nanodalelių matricių, fluoridai laikomi tinkamiausi, kadangi jie yra chemiškai stabilūs ir turi labai žemas fononų energijas. $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ ir $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ jonais legiruotos NaYF_4 nanodalelės yra laikomos efektyviausiomis apkonvertuojančiomis nanodalelėmis, pasižyminčiomis emisija regimajame spektriniame diapazone (Chen ir kt., 2014). NaYF_4 kaip pagrindinė matrica yra viena dažniausiai naudojamų, tačiau pastaruoju metu didėja susidomėjimas LiYF_4 . Ilgą laiką mokslininkams buvo iššūkis susintetinti AKND, kurios emituotų UV šviesą. Tačiau prieš kelis metus pasirodė straipsniai apie $\text{Tm}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ jonais legiruotas LiYF_4 nanodaleles,

kurios žadinamos 980 nm spinduliuote pasižymi stipria emisija tiek UV, tiek regimojoje bei infraraudonojoje spektro srityje (Mahalingam ir kt., 2009; Wang ir kt., 2010). Taigi LiYF₄ matricos panaudojimas atveria naujas optines galimybes apkonvertuojančių nanodalelių sintezėje. Kita vertus, dažniausiai LiYF₄:Tm³⁺, Yb³⁺ nanodalelių gaunamas dydis po sintezės yra didesnis nei 80 nm, o tai šiek tiek riboja jų galimą pritaikymą *in vivo*, kur dydis nulemia ar nanodalelė pateks į ląstelės vidų (Barua ir Mitragotri, 2014). Dydžio sumažinimas LiYF₄ matricos atveju nulemia mažesnę nanodalelių apkonversijos emisijos kvantinę našumą. Dėl to vis dar aktualus išlieka apkonvertuojančių nanodalelių sintezės protokolų tobulinimas ir įvairių matricių paieška. Parinkus tinkamą sintezės strategiją galima susintetinti mažesnes nei 20 nm LiYF₄:Tm³⁺, Yb³⁺ nanodaleles (Cheng ir kt., 2018).



12 pav. Apkonvertuojančių nanodalelių emisijos juostos priklausomai nuo naudojamų aktyvatorių jonų. Adaptuota pagal Lu ir kt., 2022.

Apkonvertuojančių nanodalelių sensibilizatoriai ir aktyvatoriai būna lantanoidų jonai, kurių energijos lygmenų sistema primena kopėčias. Jei nanodalelės legiravimui yra naudojamas tik vienas jonas (aktyvatorius), apkonversijos emisija dažnai būna neefektyvi dėl mažesnio sugerties efektyvumo ir kryžminės relaksacijos. Siekiant padidinti lantanoidais legiruotų nanodalelių sugertį, kartu su aktyvatoriumi dažnai papildomai naudojami sensibilizatoriai, kurie stipriai sugeria sužadavimo energiją ir užtikrina efektyvų energijos perdavimą aktyvatoriui. Renkantis aktyvatorius ir sensibilizatorius svarbu atsižvelgti į šių elementų energijos lygmenų sistemas bei galimus šuolius. Apskritai, visi trivalenčiai retųjų žemių metalų jonai pasižymi panašiomis cheminėmis savybėmis. Be to, jų neorganiniai junginiai yra puikios matricos apkonvertuojančioms nanodalelėms. Trivalentis Yb³⁺ jonas, turintis itin paprastą energijos lygių schemą, yra tinkamas apkonvertuojančių nanodalelių sensibilizatorius. Tokios nanodalelės, kurių sensibilizatoriumi yra pasirinktas Yb³⁺ jonas bus

sužadina 980 nm spinduliuote. Taip pat kaip sensibilizatorius gali būti naudojamas ir Nd^{3+} , tada nanodalelės yra sužadina 800 nm spinduliuote (Zhan ir kt., 2016). Dauguma retųjų žemių metalų jonų (išskyrus La^{3+} , Ce^{3+} , Yb^{3+} ir Lu^{3+} jonus) turi daugiau nei vieną sužadimo lygmenį ir todėl yra naudojami kaip apkonvertuojančių nanodalelių aktyvatoriai. Dažniausiai naudojami aktyvatoriai yra Er^{3+} , Tm^{3+} ir Ho^{3+} jonai (Chen ir kt., 2014). Priklausomai nuo pasirinktų aktyvatorių, apkonvertuojančios nanodalelės emituos šviesą ties skirtingais bangos ilgiais. 12 pav. yra pateikta schema, ties kokiais bangos ilgiais emisija pasižymi Er^{3+} , Tm^{3+} , Tb^{3+} , Eu^{3+} arba Ho^{3+} legiruotos nanodalelės.

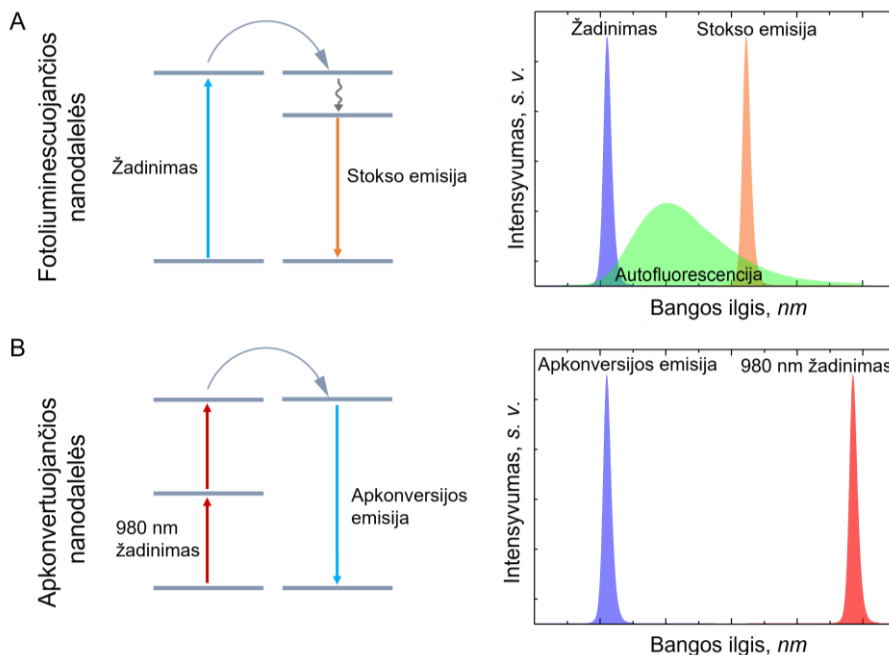
2.5.4. Apkonvertuojančių nanodalelių ir FS kompleksai

Sensibilizuotos fluorescencinės diagnostikos metu vienas didžiausių trukdžių yra audinių savitoji fluorescencija. Dauguma šiuo metu naudojamų sensibilizatorių yra sužadina toje pačioje spektrinėje srityje, kur gerai sugeria biomolekulės, todėl registruojant sensibilizatoriaus signalą matoma ir audinio savitoji fluorescencija (13 pav. A). Tikslas yra rasti fluorescuojantį žymenį, kuris kuo labiau išsiskirtų iš autofluorescencijos signalo. Šiuo atveju AKND turi pranašumą atliekant vaizdinimą *in vivo*. AKND generuoja apkonversijos emisiją regimojoje srityje, kai yra žadinamos IR spinduliuote. Žadinant biologinį audinį IR spinduliuote, endogeniniai fluoroforai nėra sužadina ir savitoji fluorescencija nestebima (13 pav. B) Kitos AKND savybės, tokios kaip ryškios emisijos juostos, didelis atsparumas fotoblyškimui, ilgas emisijos gyvavimo laikas (~ ms), mažas toksiskumas, taip pat yra tinkamos jų pritaikymui fluorescencinei diagnostikai (Cheng ir kt., 2018).

Kita vertus, retųjų žemių metalų nanodalelių sintezės metu galima įterpti jonus, kurie leistų atlikti diagnostinį vaizdinimą kitais metodais. Pavyzdžiui, kai kurių retųjų žemių metalų jonų (Gd^{3+} , Nd^{3+} , Dy^{3+}) įterpimas leidžia gauti MRT signalą. Be to, Nd^{3+} jonų įterpimas leidžia gauti emisiją IR srityje ir atlikti fluorescencinę diagnostiką IR srityje, kas taip pat praplečia retųjų žemių metalų nanodalelių pritaikymą diagnostikai. Panaudojus šių nanodalelių fluorescencines ir magnetines savybes galima sukurti multimodalinius vėžio žymenis, kuriuos galima naudoti dviem skirtingiems diagnostikos metodams: fluorescencinės diagnostikos ir MRT (Zhao ir kt., 2021).

Šiuo metu nėra duomenų, kad pačios apkonvertuojančios nanodalelės galėtų būti naudojamos kaip priešvėžinis vaistas ar generuotų aktyvias deguonies formas. Todėl siekiant gauti priešvėžinį poveikį reikia prie jų paviršiaus prijungti FS. FS pasižymi efektyviu aktyvių deguonies formų

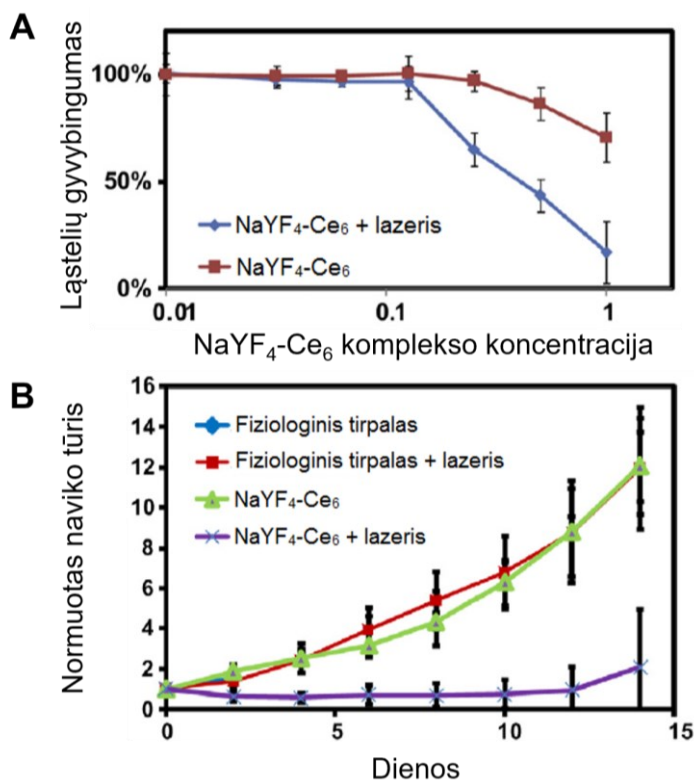
generavimu, tačiau jų sužadanimui reikalinga UV ir regimoji šviesa yra mažai skvarbi audiniuose. AKND sužadamos IR spinduliuote ir pačios emituoja regimąją šviesą, kuri yra tinkama FS sužadanimui. Taigi, galima panaudoti AKND kaip anteną IR šviesos surinkimui ir konvertavimui į regimąją šviesą bei lokaliai sužadinti FS, jau naviko viduje. Tam reikia sukurti efektyviai veikiančius AKND ir FS kompleksus.



13 pav. Fluorescuojančių nanodalelių (A) ir apkonvertuojančių nanodalelių (B) energinių suolių bei žadinimo ir emisijos spektrų palyginimas. Adaptuota pagal Jarockyte ir kt., 2020.

2011 m. pasirodė pirmasis straipsnis, kuriame Wang ir kt. pirmieji pademonstravo, kad $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ apkonvertuojančios nanodalelės (toliau trumpinama – NaYF_4) ir fotosensibilizatoriaus Ce_6 kompleksą galima panaudoti FNT (Wang ir kt., 2011). Prie $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ nanodalelių, padengtų polietilenglikoliu, buvo prijungtas Ce_6 . Pademonstruota, kad žadinant 980 nm apkonvertoriaus ir FS kompleksas generuoja singuletinį deguonį. Wang ir kt. atliko tyrimus su ląstelėmis ir nustatė, kad $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas kaupiasi HeLa žmogaus gimdos kaklelio vėžinėse ląstelėse. Taip pat atlikę MTT ląstelių gyvybingumo tyrimą, nustatė, kad veikiant 4T1 pelės krūties vėžines ląsteles $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu, didesne nei 0,1 mg/ml koncentracija, ir 980 nm lazerio spinduliuote, ląstelių gyvybingumas ženkliai sumažėja (14 pav. A). Taip pat buvo parodyta, kad sukurta sistema veikia ne tik *in vitro*, bet ir *in vivo* atliekant tyrimus su Balb/c pelėmis. Tirtoms pelėms buvo įskiepyti

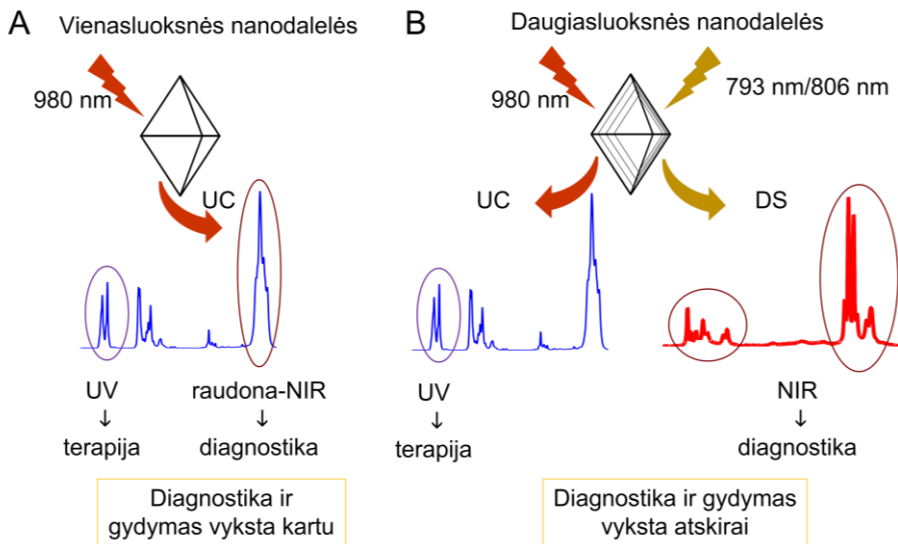
ir išauginti 4T1 ląstelių navikai. Vėliau buvo suleidžiama $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ arba fiziologinio tirpalo ir laikoma tamsoje arba 30 min veikiamą 980 nm lazerio spinduliuote (galios tankis $0,5 \text{ W/cm}^2$). Tyrimo rezultatai parodė, kad navikų tūris po FNT su $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ sumažėjo (14 pav. B). Tuo tarpu, kontroliniai navikai greičiau augo ir po dviejų savaitių pelės pradėjo kristi. Navikai, kurie buvo pilnai sunaikinti FNT metu nebesusiformavo iš naujo ir pelės išgyveno ilgiau nei 60 dienų po gydymo. Tačiau navikai, kurie dalinai buvo pažeisti, bet ne sunaikinti, po kurio laiko ataugo ir pelės išgyveno 32-42 dienas. Straipsnyje pateikiami histologiniai tyrimai, kurie parodo, kad $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas pasišalina iš pelės organizmo per 1-2 mėnesius, nesukeldamas šalutinio poveikio. Sėkmingas $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso panaudojimas FNT paskatino mokslininkus toliau kurti naujus junginius bei tirti juos įvairiose ląstelių linijose.



14 pav. A) FNT efektyvumo tyrimas *in vitro*. 4T1 pelės krūties vėžinės ląstelės buvo inkubuojamos su $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu, dalis ląstelių buvo veikiamos 980 nm lazerio spinduliuote, kita grupė buvo laikoma tamsoje. Tada buvo atliekamas MTT ląstelių gyvybingumo tyrimas. B) FNT efektyvumo tyrimas *in vivo*. Buvo tiriamos 4 grupės, pelės su įskiepytais 4T1 ląstelių navikais, kiekvienoje grupėje po 10 pelių: į naviką suleista fiziologinis tirpalas arba $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas, švitinta 980 nm lazeriu arba nešvitinta. Matome, kad atliekant FNT su $\text{NaYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu navikų augimas yra stabdomas. Adaptuota pagal Wang ir kt., 2011a.

Šiuo metu yra nemažai publikacijų, kuriose naudojamos būtent AKND-FS kompleksai vėžio teranostikai (Lu ir kt., 2022; Valle ir kt., 2022). Dažniausiai pasirenkama NaYF₄ matricos AKND, legiruotos sensibilizatoriumi Yb³⁺ ir aktyvatoriumi Er³⁺/Tm³⁺/Ho³⁺ (Valle ir kt., 2022). Tokios nanodalelės pasižymi intensyvia emisija regimojoje srityje, todėl yra tinkamos FS sužadinimui. Kai kuriais atvejais AKND papildomai legiruojamos Gd³⁺ jonais, kuriami multimodaliniai diagnostikos žymenys (Lu ir kt., 2022). Iš FS dažniausiai naudojami Ce₆, cinko ftalocianinas, metileno mėlis, bengalijos rožė, merocianinas 540 (Valle ir kt., 2022). Kuriant AKND-FS kompleksą, abi medžiagos parenkamos taip, kad AKND emisijos spektras kuo geriau persiklotų su FS sugerties spektru.

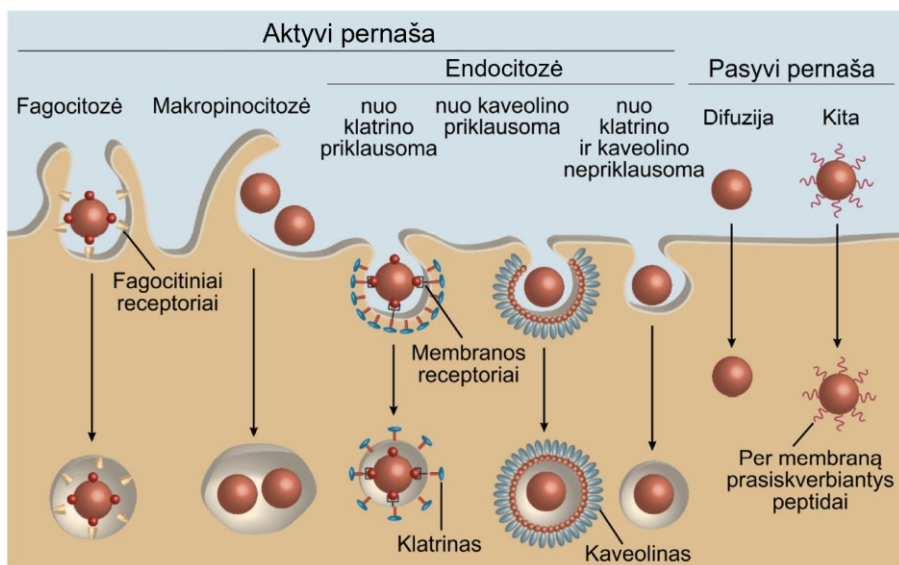
Absoliuti dauguma tyrimų, kuriuose teranostikai naudotas AKND-FS kompleksas, naudoja vieną bangos ilgį tiek diagnostikai, tiek terapijai. Vadinasi abu procesai vyksta vienu metu ir vaizdinant naviką jau yra pradedama FNT. Norint atskirti diagnostiką ir terapiją, reikia susintetinti kelių sluoksnių AKND, kurių kiekvienas sluoksnis būtų atsakingas už kitą funkciją (15 pav.). Šiame darbe būtent tokios AKND naudojamos – trijų arba keturių sluoksnių, kuriose diagnostinė ir terapinė funkcijos „įjungiamos“ skirtingais bangos ilgiais.



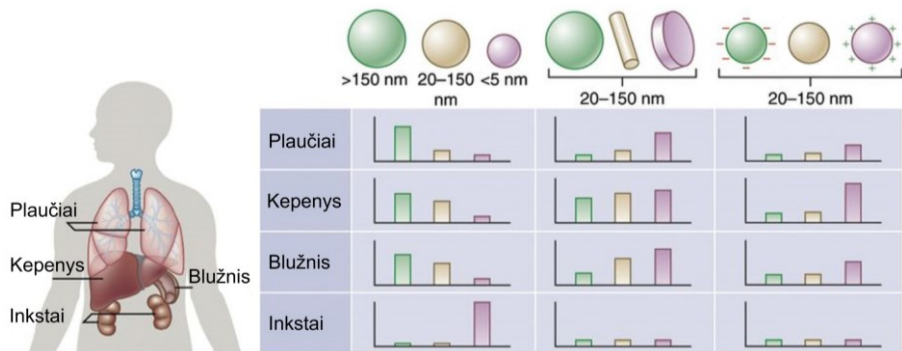
15 pav. Vienasluoksnių retųjų žemių metalų nanodalelių (A) ir daugiasluoksnių nanodalelių (B) palyginimas. Vienasluoksnių nanodalelės sužadinamos vienu bangos ilgiu ir jų emisija naudojamas tiek diagnostikai, tiek terapijai vienu metu. Daugiasluoksnių nanodalelių kiekvienas sluoksnis atlieka skirtingą funkciją ir yra sužadinamas skirtingu bangos ilgiu.

2.6. Nanodalelių pristatymas į naviką

Įvairių nanodalelių susikaupimas ir pasiskirstymas vėžinėse ląstelėse *in vitro* yra gan gerai ištirtas. Nanodalelės į ląsteles patenka aktyviosios arba pasyvosios pernašos būdu (16 pav.). Pasyvosios pernašos būdu į ląsteles gali patekti tik itin mažos nanodalelės (vos kelių nanometrų), kurios gali prasiskverbti pro plazminę membraną difuzijos būdu. Daugumą nanodalelių į ląsteles patenka aktyviosios pernašos būdu. Pagrindiniai aktyviosios pernašos nanodalelių patekimo į ląsteles būdai yra fagocitozė, nuo klatrino priklausoma endocitozė, nuo kaveolino priklausoma endocitozė, nuo klatrino ir kaveolino nepriklausoma endocitozė bei makropinocitozė (Qu ir kt., 2013; Behzadi ir kt., 2017). Šiuo metu yra žinoma, kad ND patekimo į ląsteles mechanizmą nulemia nanodalelių dydis, forma, paviršiaus padengimas, krūvis (Panzarini ir kt., 2018). Nanodalelių patekimo būdas priklausys nuo ne tik nuo pačių nanodalelių dydžio, padengimo bet ir nuo to, koks baltymų vainikas susidarys ant ND paviršiaus joms sąveikaujant su baltymine mitybine terpe arba kraujo plazmos baltymais (Voronovic ir kt., 2021). Be to, ND patekimo į ląsteles būdas priklauso ir nuo pačių ląstelių membranos receptorių, todėl tos pačios nanodalelės į skirtingas ląsteles gali patekti skirtingais būdais (Voronovic ir kt., 2021).



16 pav. Nanodalelių patekimo į ląsteles būdai yra skirstomi į aktyviąją ir pasyviąją pernašą. Aktyvioji pernaša smulkiau yra skirstoma į fagocitozę, makropinocitozę, nuo klatrino priklausomą endocitozę, nuo kaveolino priklausomą endocitozę, nuo kaveolino ir klatrino nepriklausomą endocitozę. Pasyviąją pernašą laikoma difuzija ir kiti pernašos mechanizmai, kurių metu nėra naudojama energija. Adaptuota pagal Qu ir kt., 2013.



17 pav. Nanodalelių pasiskirstymą organizme nulemia jų dydis, forma, paviršiaus padengimas. Priklausomai nuo šių parametru nanodalelės gali būti linkusios nespecifiškai susikaupti plaučiuose, kepenyse, blužnyje arba gali būti išfiltruotos inkstuose ir pašalintos per šlapimo šalinimo sistemą. Adaptuota pagal Rawal ir kt., 2019.

Nors modelinėse sistemose *in vitro* nanodalelių patekimo mechanizmai nemažai tyrinėti, nanodalelių judėjimas ir pasiskirstymas organizmo lygyje vis dar išlieka aktuali tyrimų problema. Apibendrinus pastarųjų metų tyrimus, galima teigti, kad ND pasiskirstymas *in vivo* priklauso nuo nanodalelių dydžio, formos, paviršiaus padengimo (Pearce ir O'Reilly, 2019; Rawal ir kt., 2019). ND dydis yra vienas svarbiausių veiksnių. Remiantis literatūra, dabartinėmis žiniomis, mažesnės nei 5 nm nanodalelės yra pašalinamos per šlapimo šalinimo sistemą, o didesnė nei 200 nm susikaupia kepenyse ir blužnyje. Be to, buvo pastebėta, kad mažesnės nei 100 nm ND pasidengia mažesniu kiekiu kraujo serumo baltymų opsoninų ir ilgiau cirkuliuoja kraujotakoje. Taigi optimaliausias ND dydis yra nuo 5 nm iki 100 nm. Kalbant apie nanodalelių paviršiaus padengimą, sunkiau pasakyti koks būtų optimaliausias paviršius geriausiai susikaupimui. Neigiamo krūvio paviršiaus padengimas gali sumažinti nespecifinį susikaupimą kepenyse ir blužnyje. Hidrofobinis ND paviršius padidina serumo baltymų prisijungimą ir greitesnį ND pašalinimą iš kraujotakos. Kita vertus, hidrofobinis paviršius pagerina ND patekimą į ląsteles, dėl jungimosi prie plazminės membranos. Didelio tankio polietilenglikolio paviršiaus dangalai atstumia opsoninus ir pailgina cirkuliaciją kraujyje, tačiau kartu ir sumažina susikaupimą ląstelėse. Taigi tenka balansuoti tarp geresnio patekimo į ląsteles ir ilgesnės cirkuliacijos kraujyje. Galiausiai fizikinės ir cheminės savybės lemia ne tik ND patekimą iš kraujotakos į naviką, bet ir judėjimą naviko tarpląsteline terpe ir išskverbimą į vėžines ląsteles (Pearce ir O'Reilly, 2019; Rawal ir kt., 2019).

Ilgą laiką buvo laikomasi nuomonės, kad nanodalelės pasyviai susikaups navike dėl porėtų kraujagyslių ir neišvystytos limfinės sistemos (Hashizume ir kt., 2000; Jain ir Stylianopoulos, 2010). Literatūroje šis reiškinys vadinamas

padidinto pralaidumo ir sulaikymo efektu (*angl. enhanced permeability and retention effect*) ir laikomas pagrindine vėžio nanomedicinos paradigma. Tačiau pastaraisiais metais vis pasirodo publikacijų, kuriose diskutuojama, kad visgi pasyvus nanodalelių susikaupimas navike nėra toks efektyvus kaip buvo tikėtasi (Dai ir kt., 2018; Sindhwani ir kt., 2020).

Dai ir kt. tyrė 15 nm, 55 nm ir 100 nm dydžio aukso nanodalelių pasyvų ir aktyvų patekimą į navikus po intraveninio suleidimo. Visos Au ND buvo padengtos polietilenglikoliu bei prijungtu fluorescenciniu dažu, o siekiant iširti aktyvų pernešimą, dalis ND buvo modifikuotos monokloniniu antikūnu trastuzumabu, kuris jungiasi prie krūties ir kiaušidžių navikinių ląstelių paviršiaus receptorių ir yra patvirtintas naudojimui klinikai. Kaip modelinis organizmas buvo pasirinktos CD-1 plikos pelės su įskiepytu žmogaus kiaušidžių naviku (įskiepytos žmogaus kasos vėžinės ląstelės SKOV-3). Au ND buvo leidžiamos į kraujotaką. Praėjus 24 val. po suleidimo visas navikas buvo išpjaujamas ir mechaniškai bei fermentiškai suskaidomas į pavienių ląstelių suspensiją. Vėžinių ląstelių ir makrofagų populiacijos buvo pažymėtos antikūnais, o nepažymėtos naviko ląstelės buvo priskirtos kitų ląstelių kategorijai. Supernatantas po centrifugavimo buvo priskirtas tarpląsteliniam naviko turiniui. Tada naviko ląstelės buvo surūšiuotos į atskiras populiacijas naudojant fluorescencijos aktyvuotą ląstelių rūšiavimą (*angl. fluorescence-activated cell sorting*), o vėliau kiekvienai populiacijai buvo atlikta kiekybinė aukso kiekio nustatymo analizė, induktyviai susietos plazmos masės spektrometrijos (*angl. inductively coupled plasma–mass spectrometry*) metodu. Tyrimų rezultatai parodė, kad tik 0,7 % į kraujotaką suleistų monokloniniu antikūnu trastuzumabu modifikuotų nanodalelių pasiekia naviką, o dėl naviko heterogeniškumo vėžines ląsteles pasiekia tik 0,0014 % iš sistemiškai suleistų nanodalelių. Pasyviai į naviką prasiskverbė dar mažiau nanodalelių, o 100 nm Au ND nemonifikuotos antikūnais į vėžines ląsteles nepateko visai. Publikacijos autoriai nustatė, kad nanodalelės užstrigo tarpląsteliniame užpilde bei buvo „išgaudytos“ navike esančių makrofagų (Dai ir kt., 2018).

Vėliau ta pati mokslininkų grupė tyrė pasyvų nanodalelių patekimą į navikus per kraujagyslių poras. Atlikę tyrimus padarė išvadą, kad labai nedidelis kiekis nanodalelių į naviką patenka pasyviai dėl padidinto pralaidumo ir sulaikymo efekto, o didžioji dalis nanodalelių į navikus patenka aktyviosios pernašos, vykstančios kraujagyslių endotelio ląstelėse, metu (Sindhwani ir kt., 2020). Vaistų ir nanodalelių pasyvus patekimas iš kraujotakos į naviką priklauso nuo medžiagos dydžio. Autoriai tyrė chemoterapinio vaisto cisplatinos (300 Da) bei 50 nm ir 100 nm dydžių Au ND susikaupimą navikuose, įskiepytuose pelėse. Kontrolinei pelių grupei

į kraujotaką suleistos medžiagos navike susikaupė tiek aktyviosios, tiek pasyviosios pernašos metu. Kita pelių grupė prieš pradėdant tyrimus buvo fiksuojama suleidžiant į širdį 4 % formaldehido ir 0,5 % gliutaraldehido tirpalą. Tyrimo metu šios grupės pelių kraujotaka buvo dirbtinai varinėjama. Tokiu būdu buvo išjungiamas aktyvioji pernaša ir paliktas tik pasyvus medžiagų prasiskverbimas pro kraujagyslių poras. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad 35 % cisplatinos, susikaupusio navike, į vėžines ląsteles pateko dėl kraujagyslių porų. Atlikus analogišką tyrimą su 50 nm dydžio Au ND, nustatyta, kad tik 3 % Au ND pateko pasyviai į naviką, o 97 % – aktyviosios pernašos metu. Tuo tarpu tiriant 100 nm dydžio Au ND patekimą, nustatyta, kad tokių nanodalelių 25 % patenka per porėtas kraujagysles. Taigi pasyvus susikaupimas navike priklauso nuo įvairių parametrų, vienas jų ND dydis, ir gali lemti 3–25 % viso ND susikaupimo navike (Sindhvani ir kt., 2020). Papildomai publikacijos autoriai ištyrė pelėse įskiepytų ir onkologinių pacientų pooperacinių navikų kraujagysles. Tyrimai parodo, kad tiek žmonių, tiek eksperimentinių gyvūnų navikų kraujagyslės yra panašios ir yra sandarios, o poros kraujagyslėse pasitaiko retai (Sindhvani ir kt., 2020).

Nanodalelių patekimą į vėžines ląsteles galima pagerinti prie jų prijungus specifinius ligandus ar antikūnus, prieš vėžinių ląstelių membranose esančius receptorių ar antigenus (Pearce ir O'Reilly, 2019). Paprastai kaip taikynys parenkamos biomolekulės, kurios būdingos tik vėžinėms ląstelėms arba jose yra ženkliai labiau išreikštas nei sveikuose audiniuose. Kai ND prisijungia prie vėžinės ląstelės membranos, ji patenka į ląstelę endocitozės būdu. ND gali būti nukreiptos nebūtinai prieš vėžines ląsteles, o pavyzdžiui, prieš naviko kraujagyslių ląsteles, tokiu būdu pagerinant ND susikaupimą navike. Daugelyje pastarojo dešimtmečio publikacijų aprašomas nanodalelių funkcionalizavimas su tiksliniais ligandais ir jų veiksmingumo vertinimas iki klinikiniuose modeliuose, tačiau dalis tokių tyrimų jau pasiekė ir kliniką. Dažniausiai klinikiniai tyrimai atliekami su liposomomis, kuriose būna įkapsuliuotas klinikoje naudojamas priešvėžinis vaistas, o liposomos paviršius modifikuotas ligandais ar antikūnais (Pearce ir O'Reilly, 2019).

Nepaisant pažangos, vis dar susiduriama su iššūkiais siekiant tikslingai nunešti nanodaleles į naviką. Visų pirma, nanodalelėms patekus į kraujotaką jos pirmiausia sąveikauja su kraujo serumo baltymais, susidaro baltymų vainikas, kuris turi daugiau įtakos ND patekimui į vėžines ląsteles, nei ND paviršiaus padengimas (Voronovic ir kt., 2021). ND paviršiaus modifikavimas ir funkcionalizavimas tikslingam nunešimui tebėra didelis iššūkis, nes reikia atsižvelgti į daugelį parametrų, kurie gali lemti ND ir biomolekulių sąveiką organizme (Khalili ir kt., 2022). Kita išliekanti didelė problema, apsunkinanti apskritai visų nanodarinių pritaikymą klinikoje, yra funkcionalizuotų

nanodarinių masinė gamyba bei paruoštų preparatų homogeniškumas. Netgi nedideli gamybos procesų svyravimai gali sudaryti visiškai skirtingus produktus, todėl labai svarbu sukurti procesus, skirtus nuosekliam ir tiksliam sintezės mastelio padidinimui ankstyvose tyrimų stadijose, kad būtų išvengta nesėkmių priartėjus prie taikymo klinikoje (Pearce ir O'Reilly, 2019).

2.7. Mezenchiminės kamieninės ląstelės

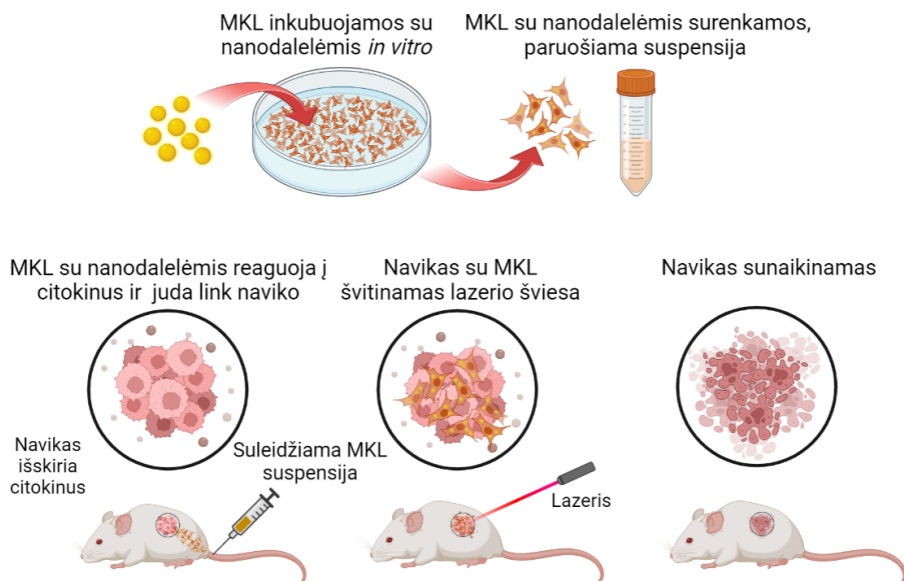
Naviko heterogeniškumas, kurį nulemia greitas ir netolygus naviko augimas, tankus tarpląstelinis užpildas, pakitęs tarpląstelinio skysčio slėgis, atsirandantis dėl netolygios angiogenezės navike, slopina nanodalelių įsiskverbimą į naviką (Su ir Hu, 2018). Be to, po suleidimo į kraujotaką, kraujo serumo baltymai opsoninai, jungiasi prie nanodalelių ir daro jas atpažįstamas imuninei sistemai, todėl imuninės ląstelės fagocitai jas pašalina iš kraujotakos (Wani ir kt., 2020). Kita vertus, net ir tiesiai į naviką suleistų nanodalelių judėjimas navike yra ribotas. Buvo pademonstruota, kad po intranavikinės injekcijos praėjus 24 val. tik 10 % naviko ląstelių turėjo nanodalelių (Jarockyte ir kt., 2018). Taigi, pastarieji tyrimai rodo, kad reikia ieškoti tikslesnių nanodalelių pernešimo į naviką būdų. Pastaraisiais metais, kaip galima priemonė geresnei nanodalelių pernašai į naviką, tyrinėjamos mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL).

Mezenchiminės kamieninės ląstelės, dar vadinamos mezenchiminėmis stromos ląstelėmis, yra suaugusiųjų kamieninės ląstelės, galinčios savaime atsinaujinti ir diferencijuotis (Jiang ir kt., 2002). MKL funkcija organizme yra palaikyti audinių vientisumą. Paprastai MKL yra tolygiai pasiskirsčiusios visame organizme, užima joms būdingas nišas, tačiau gavusios signalą, migruoja į žaizdą ar kitą uždegimą, įskaitant vėžį, kaupiasi pažeistuose audiniuose, prisideda prie audinių regeneracijos ir žaizdų gijimo (Motegi ir Ishikawa, 2017). MKL turi didelį potencialą medicinos srityje dėl savo regeneracinių savybių, priešnavikinio poveikio ir migracijos link uždegimo bei naviko dėl chemokinių stimuliacijos (Berebichez-Fridman ir Montero-Olvera, 2018).

MKL gali būti išskiriamos iš įvairių audinių. Pirmiausiai šios ląstelės buvo rastos kaulų čiulpuose (Friedenstein ir kt., 1970), tačiau vėliau buvo nustatytos kituose audiniuose, įskaitant riebalinį audinį, raumenis, kraują, plaukų folikulus, dantis, placenta ir virkštelę (da Silva Meirelles ir kt., 2006). MKL taip pat gali būti išskiriamos iš perteklinės odos, kuri lieka po plastinių operacijų ir yra utilizuojama (Dapkute ir kt., 2021). Nors MKL gali turėti skirtingas savybes, priklausomai nuo jų kilmės audinio, *in vitro* auginamos MKL turi atitikti tris minimalius kriterijus, kuriuos nustatė Tarptautinė ląstelių

terapijos draugija (*angl. the International Society for Cellular Therapy*) (Dominici ir kt., 2006). Pirma, MKL turi prisikabinti prie plastiko auginamos *in vitro*. Antra, MKL turi pasižymėti teigiama paviršiaus antigenų CD73, CD90 ir CD105 raiška, tačiau neturėti kraujo ląstelėms būdingų paviršiaus antigenų: CD45, CD34, CD14 arba CD11b, CD79 α arba CD19 ir HLA-DR. Trečia, MKL turi diferencijuotis į adipocitus, chondrocitus ir osteoblastus *in vitro*, palaikant tam tikras sąlygas (Dominici ir kt., 2006).

MKL dėl savo gebėjimo migruoti link naviko yra plačiai tyrinėjamos kaip priešvėžinių vaistų, terapinių genų ar nanodalelių pernešimo priemonė (Li ir kt., 2016). Šiuo metu vis daugėja publikacijų, kuriose tiriamos MKL kaip nanodalelių nešiklis, tokie tyrimai dažniausiai atliekami su eksperimentiniais gyvūnais, kuriems buvo įskiepyti navikai (Cao ir kt., 2014; Luo ir kt., 2020; Dapkute ir kt., 2021). 18 pav. pateikta apibendrinta schema, vaizduojanti nanodalelių pernešimą į naviką su MKL modeliniuose gyvūnuose.



18 pav. Apibendrinta schema vaizduojanti mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) panaudojimą nanodalelių pernešimui į naviką eksperimentiniuose gyvūnuose. MKL *in vitro* inkubuojamos su nanodalelėmis. Tada ląstelės surenkamos ir paruošiama suspensija, kuri yra suleidžiama eksperimentiniam gyvūnui su įskiepytu naviku. MKL su nanodalelėmis migruoja į naviką. Vėliau navikas veikiamas lazerio spinduliuote, sukeliama fotosensibilizacinis arba fototerminis poveikis, vėžinės ląstelės yra pažeidžiamos ir navikas yra sunaikinamas.

Cao ir kt. panaudojo iš žiurkių kaulų čiulpų išskirtas MKL ir silicio nanodaleles su įterptu FS pelės naviko FNT. Nanodalelės su FS neturėjo toksinio poveikio MKL. Siekiant iširti MKL jungimąsi prie vėžinių ląstelių, žmogaus krūties vėžio ląstelės MCF-7 ir MKL su arba be ND kartu buvo suleidžiamos į plikų pelių nugarą, po oda. Dėl MKL savybės judėti link

vėžinių ląstelių, MKL turėtų išlikti įskiepytame navike. Autoriai nustatė, kad inkubacija su ND šios MKL savybės nepakeičia. Taip pat tyrimo autoriai pademonstravo, kad panaudojus MKL su ND, ir pritaikius FNT praėjus parai po ląstelių suleidimo, susiformavo statistiškai reikšmingai mažesnio tūrio navikai, lyginant su kontrole (Cao ir kt., 2014).

Luo ir kt. juodojo fosforo pagrindu sukurtas nanosferas panaudojo fototerminėi terapijai. Kaip modelinė sistema buvo naudojamos plikos Balb/c pelių patelės, su įskiepytais gliomos navikais. Nanosferos į naviką buvo pernešamos naudojant iš žmogaus virkštelės išskirtas MKL, suleidžiant MKL į uodegos veną. Kontrolinėms grupėms buvo leidžiamas buferis arba vien nanosferos. Praėjus 2 paroms po injekcijos, naudojant 808 nm lazerį buvo atliekama fototerminė terapija. Tyrimo rezultatai parodė, kad naudojant MKL nanosferų pernešimui navikas pilnai sunaikinamas fototerminės terapijos metu. Naudojant vien nanosferas navikas taip pat sumažėjo, tačiau MKL panaudojimas sustiprino efektą (Luo ir kt., 2020).

Dapkute ir kt. naudojo iš odos išskirtas MKL CdSe/ZnS kvantinių taškų sujungtų su Ce₆ pernešimui į naviką. Šiame tyrime, priešingai nei anksčiau aprašytuose, buvo naudojamas dviejų pakopų švitinimas. Pirmojo švitinimo metu inicijuojama fotosensibilizacinė reakcija pačiose MKL, ląstelės žūsta ir išleidžia krovinių į aplinką. Po kurio laiko vėžinės ląstelės surenka ND-FS kompleksus iš aplinkos ir tada atliekamas antrasis švitinimas, kurio metu sunaikinamos vėžinės ląstelės. Tyrimai parodė, kad MKL sėkmingai nunešė kompleksą į naviką ir atlikus dviejų pakopų švitinimą, buvo sukelta vėžinių ląstelių žūtis. Tyrimai parodė kvantinio taško ir Ce₆ komplekso terapinį veiksmingumą: navikų turinčių pelių išgyvenamumas statistiškai reikšmingai padidėjo, o naviko progresavimas ir metastazės sulėtėjo (Dapkute ir kt., 2021).

Tai tik keletas pavyzdžių, kaip MKL gali būti pritaikytos nanodalelių pernešimui į naviką. Nors ši tyrimų sritis yra gan nauja, pastaruoju metu sulaukia vis daugiau mokslininkų susidomėjimo ir šiuo metu turimi rezultatai rodo, kad MKL pritaikymas nanomedicinoje turi didelį potencialą.

3. MEDŽIAGOS IR METODAI

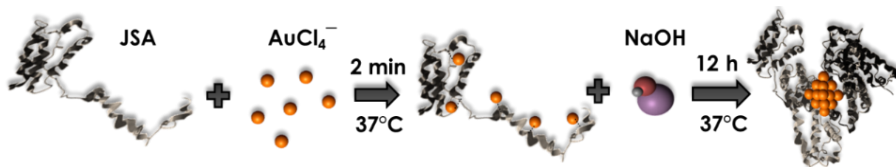
3.1. Nanodelelių sintezė

3.1.1. Aukso nanoklasterių sintezė

Aukso nanoklasterių sintezę atliko Nacionalinio vėžio instituto Biomedicininės fizikos laboratorijos jaunesnysis mokslo darbuotojas Vilius Poderys.

JSA-Au NK sintezė buvo atliekama pagal anksčiau aprašytą metodiką (Xie ir kt., 2009), su keliais sintezės eigos pakeitimais. Sintezės eiga:

1. 5 ml vandeninio HAuCl_4 tirpalo (10 mM, 37 °C) supilama į 5 ml JSA tirpalą (50 mg/ml, 37 °C) nuolatos maišant.
2. Po 2 minučių į šį mišinį įpilama 0,25 ml NaOH 1 M tirpalo.
3. Tirpalas paliekamas maišytis 12 val. palaikant 37 °C temperatūrą.



19 pav. JSA-Au NK sintezė schema.

JSA (V frakcija), vandenilio tetrachlorauratas ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.9 %)) bei natrio hidroksido granulės (NaOH (>99 %)) buvo pirkti iš Sigma-Aldrich (Vokietija). Dejonizuotas vanduo buvo gaminamas naudojant vandens gryninimo sistemą MicroPure UV (TKA, Vokietija).

Analogiškai buvo atliekama ir žmogaus kraujo plazmos baltymais stabilizuotų aukso nanoklasterių sintezė. Kraujo plazma buvo gauta iš Nacionalinio kraujo centro. Kraujo plazma buvo filtruojama per 0,22 μm filtrą, taip išvalant ją nuo didesnių agregatų. Buvo išmatuojama plazmos sugertis ir apskaičiuojama baltymų koncentracija, pagal formulę (Stoscheck, 1990):

$$C_{\text{baltymo}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}, \quad (1)$$

kur C – koncentracija, A – optinis tankis ties nurodytu bangos ilgiu.

Į nufiltruotą kraujo plazmą (5 mL, 37 °C, c = 50 mg/ml) buvo pilamas NaOH tirpalas (0,5 ml, 1.0 M), nuolatos maišant. Po to lėtai supilamas HAuCl_4 tirpalas (5 mL, 37 °C, 1,8 mg/ml). Tirpalas paliekamas maišytis 12 val. palaikant 37 °C temperatūrą. Plačiau sintezės eiga aprašyta publikacijoje (Jarockyte ir kt., 2022a).

Po sintezės Au NK tirpalai yra šarminiai (pH ~ 11). Šarminis pH gali sukelti citotoksinį poveikį ląstelėms. Siekiant to išvengti, buvo atliekama tirpiklio pakeitimo procedūra ir Au NK tirpiklis pakeičiamas į fosfatinio buferio druskų tirpalą (*angl. phosphate-buffered saline* – PBS) pH 7,4 (Gibco, JAV). Tam buvo naudojamos PD MidiTrap G-25 kolonėlės (GE Healthcare, JAV). Be to, prieš eksperimentus su ląstelėmis, visi Au NK tirpalai buvo filtruojami naudojant 0,22 μm švirkšto filtrą (polietersulfono membrana, TPP, Šveicarija), kad būtų išvengta bakterijų užteršimo ląstelių tyrimuose.

3.1.2. Retųjų žemių metalų nanodalelių sintezė

Retųjų žemių metalų nanodalelių sintezę, modifikavimą ir paruošimą eksperimentams atliko dr. Artiom Skripka, Kvebeko universiteto Nacionaliniame mokslinių tyrimų institute, Kanadoje. Mokslininkų grupei vadovauja prof. Fiorenzo Vetrone. Šios nanodalelės buvo sintetamos terminės dekompozicijos metodu, pilna sintezės eiga aprašyta 2019 m. Skripka ir kt. publikacijoje (Skripka ir kt., 2019).

Šiame darbe yra aprašomos dviejų tipų retųjų žemių metalų nanodalelės: $\text{LiYF}_4:\text{Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}@\text{LiYF}_4@\text{LiYF}_4:\text{Nd}^{3+}$ (toliau – LiYF_4), sudarytos iš branduolio ir dviejų apvalkalų bei $\text{LiLuF}_4:\text{Nd}^{3+}@\text{LiLuF}_4@\text{LiYbF}_4:\text{Er}^{3+}@\text{LiLuF}_4$ nanodalelės (LiLuF_4), sudarytos iš branduolio ir 3 apvalkalų. LiYF_4 nanodalelės po sintezės buvo dengiamos fosfolipidais (DOPC/PEG-DOPE) ir laikomos vandenyje. Tuo tarpu LiLuF_4 nanodalelės buvo dengiamos komerciškai įsigytu polimeru (*angl. Poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)*, Sigma-Aldrich, JAV). Vėliau buvo išdžiovinamos ir plėvelės pavidalu laikomos iki tolimesnio panaudojimo.

Nanodalelių ir Ce_6 kompleksai buvo ruošiami Nacionaliniame vėžio institute, Biomedicininės fizikos laboratorijoje.

Ce_6 milteliai buvo tirpinami PBS (pH 7,4) ir paruošiamas 1 mM koncentracijos pradinis Ce_6 tirpalas. Tiksli Ce_6 pradinio tirpalo koncentracija kiekvieną kartą buvo išmatuojama su sugerties spektrofotometru ir apskaičiuojama pagal formulę:

$$A = \epsilon cl, \quad (2)$$

kur A – optinis tankis, ϵ – ekstinkcijos koeficientas, l – optinis kelias.

LiYF_4 nanodalelės ir Ce_6 kompleksas buvo ruošiamas LiYF_4 pradinį tirpalą skiedžiant 10 kartų su PBS (pH 7,4) iki 0,8 mg/ml LiYF_4 koncentracijos ir pridėdant 1 mM koncentracijos Ce_6 pradinio tirpalo tiek, kad galutinė Ce_6 koncentracija mišinyje būtų 10 μM. Pagamintas tirpalas buvo laikomas šaldytuve ir saugomas nuo šviesos poveikio iki tolesnio naudojimo tyrimams. Sumaišius LiYF_4 ir Ce_6 vandeninius tirpalus, Ce_6 įsiterpia į LiYF_4 nanodalelės

fosfolipidinį apvaskalą ir įsitvirtina dėl hidrofobinės sąveikos tarp Ce_6 nepolinės dalies ir amfifilinių fosfolipidų sluoksnio (Valanciunaite ir kt., 2010). Susiformuoja $LiYF_4$ nanodalelės ir Ce_6 kompleksas, kuris toliau bus žymimas $LiYF_4-Ce_6$.

Ruošiant $LiLuF_4-Ce_6$ kompleksą, $LiLuF_4$ nanodalelių plėvelės buvo mirkomos šarminiame NaOH (0,02 M) tirpale su ištirpintu Ce_6 (1,2 mM). Plėvelės buvo tirpinamos ultragarso vonelėje, palaikant 50 °C temperatūrą 2-3 val., kol tirpalas išskaidėdavo. Kadangi kompleksacijai buvo naudojamas Ce_6 perteklius, tirpalas buvo centrifuguojamas 30 min naudojant 9500×g. Nusėdus nanodalelėmis su prisijungusiu Ce_6 , supernatantas su laisvu Ce_6 būdavo pašalinamas, kompleksas resuspenduojamas distiliuotame vandenyje. Toks paruoštas $LiLuF_4-Ce_6$ komplekso vandeninis tirpalas buvo laikomas šaldytuve, apsaugotas nuo šviesos iki tolimesnio panaudojimo.

3.2. Nanodalelių savybių tyrimai

3.2.1. Spektroskopiniai tyrimai

Sugerties spektrai buvo matuojami naudojant Varian Cary Win UV-VIS sugerties spektrofotometrą (Varian Inc., Australija). Au NK fotoluminescencijos bei retųjų žemių metalų nanodalelių emisijos spektrai buvo matuojami spektrometru Edinburgh Instruments FLS920 (Edinburgh Instruments, Didžioji Britanija). Taip pat šiuo prietaisu buvo matuojamos ir fluorescencijos gyvavimo laikų kinetikos. Spekttriniam matavimams buvo naudojamos 1 cm optinio kelio kvarcinės kiuvetės (Hellma Optik, Vokietija).

3.2.2. Hidrodinaminio skersmens matavimai

Hidrodinaminis dalelių skersmuo buvo matuojamas naudojant dinaminės šviesos sklaidos metodą. Mėginiai buvo matuojami naudojant dalelių dydžio ir zeta potencialo analizatorių Zeta Plus PALS (Brookhaven Inc., JAV).

3.2.3. Aktyvių deguonies formų generavimo tyrimas

Singuletinio deguonies generavimo tyrimui buvo naudojamas singuletinio deguonies indikatorius – SOSG (*angl. Singlet Oxygen Sensor Green reagent*) (Invitrogen, Thermo Fisher, JAV). Šis reagentas pasižymi išskirtiniu jautrumu singuletiniam deguoniui ir kitoms aktyvioms deguonies formoms, tokioms kaip hidroradikalai ar superperoksidai. SOSG yra fluorescuojantis reagentas, jam sureagavus su singuletiniu deguonimi susidaro SOSG endoperoksidai (SOSG-EP), kuris labai intensyviai fluorescuoja. SOSG-EP pasižymi stipria

sugertimi ties 510 nm bangos ilgiu, bei fluorescencijos juosta 525–536 nm, kurios tiksliai padėtis priklauso nuo terpės pH bei SOSG ir SOSG-EP molekulių santykio.

Au NK gebėjimas generuoti $^1\text{O}_2$ šviesoje buvo tiriamas paruošus šiuos bandinius (po 4 ml):

1. SOSG (pradinė koncentracija $50 \mu\text{M}$) ir PBS tirpalas (galutinė koncentracija $c_{\text{SOSG}} = 5 \mu\text{M}$).
2. 5,5 mg/ml JSA/Rh⁺ plazma/Rh⁻ plazma, PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 5 \mu\text{M}$) tirpalas.
3. 5,5 mg/ml JSA-Au NK/Rh⁺-Au NK/Rh⁻-Au NK, PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 5 \mu\text{M}$) tirpalas.
4. $1,25 \mu\text{M}$ Ce₆ PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 5 \mu\text{M}$) tirpalas.

Siekiant ištirti ar LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆ kompleksai generuoja $^1\text{O}_2$ buvo paruošti šie bandiniai (po 4 ml) su LiYF₄/LiLuF₄, Ce₆, LiYF₄-Ce₆/LiLuF₄-Ce₆ kompleksu ir SOSG reagentu:

1. SOSG (pradinė koncentracija 1mM) ir PBS tirpalas (galutinė koncentracija $c_{\text{SOSG}} = 1 \mu\text{M}$).
2. 0,1 mg/ml LiYF₄/LiLuF₄, PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 1 \mu\text{M}$) tirpalas.
3. 0,1 mg/ml LiYF₄-Ce₆/LiLuF₄-Ce₆ kompleksas, PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 1 \mu\text{M}$) tirpalas.
4. $1 \mu\text{M}$ Ce₆ PBS tirpalas ir SOSG ($c_{\text{SOSG}} = 1 \mu\text{M}$) tirpalas.

Visi tirpalai buvo padalinti po 2 ml į skirtingas kiuvetes. Tiriamieji bandiniai buvo švitinami skirtingais laiko intervalais 405/806/980 nm bangos ilgių lazerio spinduliuote. SOSG fluorescencijos spektrai buvo išmatuoti skirtingose švitinimo etapuose (t_1 , t_2 ir t.t.). Tuo tarpu kontroliniai bandiniai buvo laikomi tamsoje.

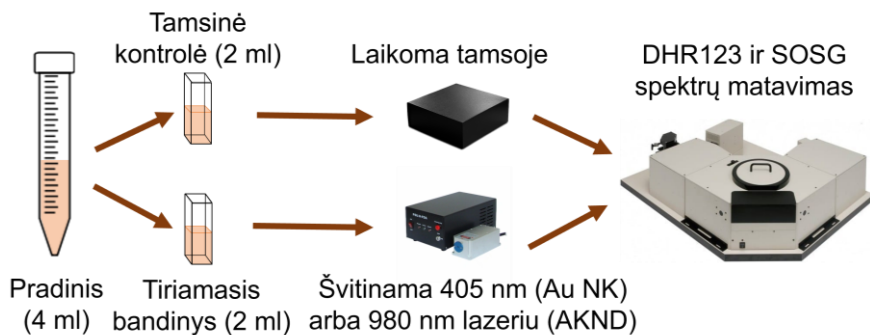
Švitinamuose bandiniuose su Au NK susidariusių kitų ROS nustatymui buvo naudojamas dihidrorodaminas 123 – DHR123 (*angl. dihydrorhodamine 123*) (Invitrogen, Thermo Fisher, JAV). DHR123 nefluorescuoja, tačiau aplinkoje esant aktyvių deguonies formų, yra oksiduojamas iki katijoninio rodamino 123, kuris pasižymi ryškia fluorescencija žalioje spektro srityje ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$).

Prieš eksperimentą buvo paruošiami šie tirpalai (po 4 ml).

1. DHR123 (pradinė koncentracija $33 \mu\text{M}$) ir PBS tirpalas (galutinė koncentracija $c_{\text{DHR123}} = 3.3 \mu\text{M}$).
2. 5,5 mg/ml JSA/Rh⁺ plazma/Rh⁻ plazma, PBS tirpalas ir DHR123 ($c_{\text{DHR123}} = 3.3 \mu\text{M}$) tirpalas.
3. 5,5 mg/ml JSA-Au NK/Rh⁺-Au NK/Rh⁻-Au NK, PBS tirpalas ir DHR123 ($c_{\text{DHR123}} = 3.3 \mu\text{M}$) tirpalas.

4. 1,25 μM Ce_6 PBS tirpalas ir DHR123 ($c_{\text{DHR123}} = 3.3 \mu\text{M}$) tirpalas.

Tirpalai buvo padalinti po 2 ml į skirtingas kiuvetes. Tiriamieji bandiniai buvo švitinami skirtingais laiko intervalais 405 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote. DHR123 fluorescencijos spektrai buvo išmatuoti skirtingose švitinimo etapuose (t_1 , t_2 ir t.t.). Tuo tarpu kontroliniai bandiniai buvo laikomi tamsoje. Apibendrintai eksperimento eiga pavaizduota 20 pav.



20 pav. Aktyvių deguonies formų susidarymo švitinimo metu tyrimo schema. ROS indikatorius sumaišomas su tirama medžiaga, paruošiamas vienas tirpalas, kuris vėliau padalinamas į dvi kiuvetes. Viena kiuvetė laikoma tamsoje, o kita švitinama lazerio spinduliuote. Abiejų kiuvečių spektrai matuojami kartu.

Visuose eksperimentuose švitinimo dozė (D , J/cm^2) nuo švitinimo laiko buvo apskaičiuota remiantis šia formule:

$$D = \frac{P \cdot t}{S} \quad (3)$$

kur P – naudoto lazerio galia [W], t – švitinimo laikas [s], S – švitinamas plotas [cm^2].

3.3. Nanodalelių tyrimai ląstelėse

3.3.1. Vėžinių ląstelių linijos

Tyrimuose buvo pasirinkta naudoti dvi žmogaus vėžinių ląstelių linijas – MCF-7 ir MDA-MB-231. Šios ląstelių linijos yra žmogaus krūties vėžinės ląstelės, dažnai naudojamos kaip modelinė sistema įvairiems priešvėžinių vaistų tyrimams. MCF-7 ląstelės buvo įsigytos iš Europos gyvūninių ląstelių kultūrų kolekcijos (ECACC, JK). MDA-MB-231 ląstelės buvo įsigytos iš Amerikos tipo ląstelių kultūrų kolekcijos (ATCC, JAV).

Abi ląstelių linijos *in vitro* auga prikibusios prie paviršiaus. MCF-7 ląstelės yra daugiakampio formos, augdamos sudaro kolonijas, o MDA-MB-231 ląstelės yra pailgos, žvaigždžiškos formos. Abi ląstelių linijos yra invazinės krūties karcinomos ląstelės, tačiau jos turi daug fenotipinių bei genotipinių skirtumų (Theodossiou ir kt., 2019). MCF-7 ląstelės išreiškia epitelio fenotipą,

priešingai nei MDA-MB-231, kurios yra labiau mezenchiminės (Gjerdrum ir kt., 2010). MCF-7 ląstelės turi estrogenų ir progesterono receptorius, o MDA-MB-231 yra trigubai neigiamos ląstelės (neturi estrogeno, progesterono ir žmogaus epidermio augimo faktoriaus 2-ojo tipo receptorių) (Holliday ir Speirs, 2011; Theodossiou ir kt., 2019). Trigubai neigiamas krūties vėžys pasižymi agresyvesne eiga, didesniu atsparumu chemoterapijai (Reddy ir kt., 2018). Kadangi MDA-MB-231 ląstelės neturi estrogeno receptorių, jos yra nejautrios gydymui prieš estrogeną nukreiptais chemoterapiniais vaistais, tokiais kaip tamoksifenas (Osborne, 1998). Taip pat MDA-MB-231 pasižymi atsparumu ir kitiems chemoterapiniams vaistams (Chen ir kt., 2011).

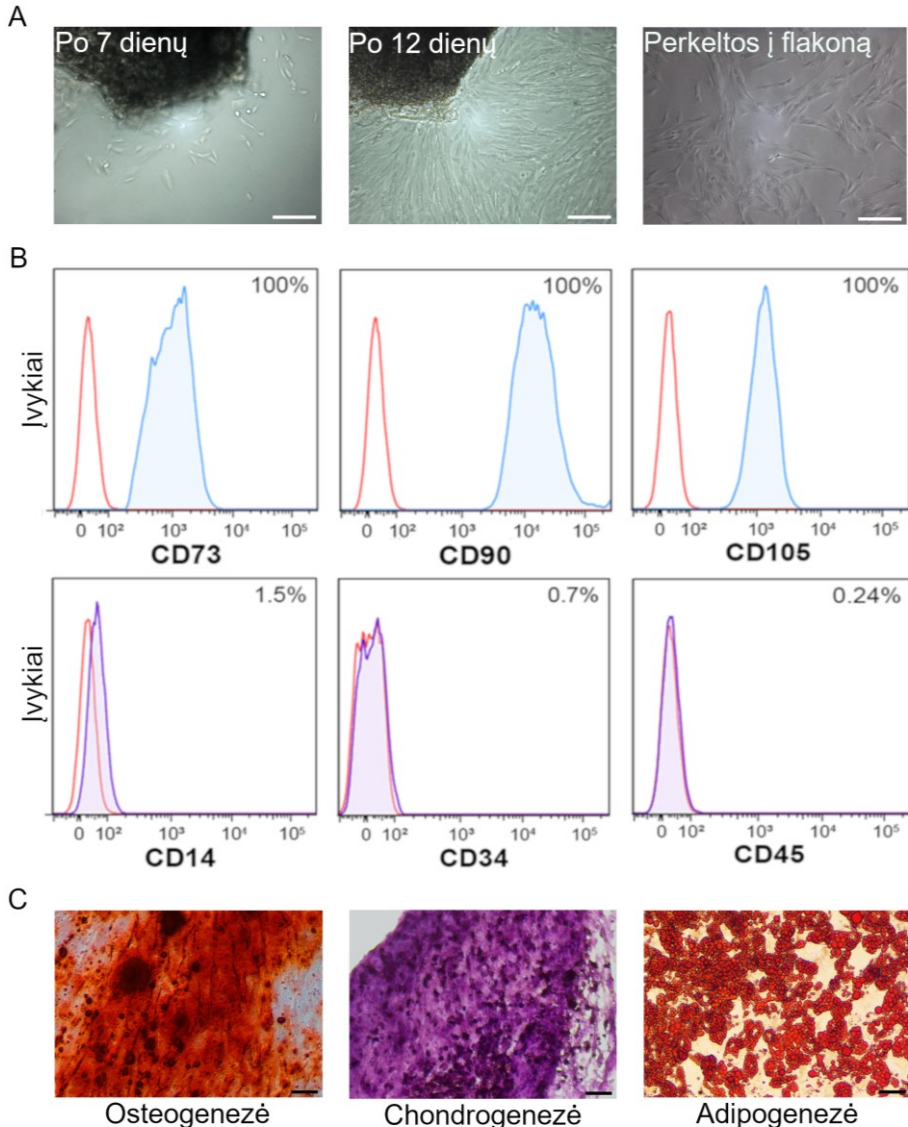
3.3.2. MKL išskyrimas ir charakterizavimas

Šiame tyrime buvo naudojamos mezenchiminės kamieninės ląstelės išskirtos iš žmogaus odos, likusios po blefaroplastikos, atliktos Baltijos Amerikos klinikoje, Vilniuje. Ląstelių išskyrimui buvo gautas bioetikos leidimas iš Vilniaus regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto (leidimo Nr. 158200-18 / 6-1036-548), visi pacientai pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Šiame darbe aprašytuose eksperimentuose naudotos MKL išskirtos iš trijų donorų. MKL išskyrimas buvo atliekamas pagal Dapkutės ir kt. aprašytą procedūrą (Dapkute ir kt., 2021). Prieš atliekant eksperimentus su MKL, pirmiausia buvo nustatomas jų imunofenotipas. Taip pat naudojant StemPro MKL diferenciacijos terpę (Gibco, Thermo Fisher Scientific, JAV) ištiriamas gebėjimas diferencijuoti į kremzlinį, riebalinį ir kaulinį audinius, tokiu būdu patvirtinama, kad naudojamos ląstelės tikrai yra MKL. Ląsteles šiam tyrimui išskyrė, charakterizavo ir paruošė eksperimentams Nacionalinio vėžio instituto biofizikė Alėja Marija Daugėlaitė, diferenciacijos tyrimą atliko biofizikas Džiugas Jurgutis.

21 pav. yra parodytas MKL ląstelių išskyrimas ir charakterizavimas. 21 pav. A dalyje galime matyti, kad praėjus 7 dienoms po ląstelių išskyrimo procedūros buvo matomos pavienės ląstelės išlendančios iš eksplanto. Praėjus 12-ai dienų aplink eksplantą buvo matoma daug pailgų, verpstės formos ląstelių. Išskirtoms odos MKL buvo būdinga įprasta verpstės formos morfologija ir prisitvirtinimas prie plastiko paviršiaus (21 pav. A). Imunofenotipo nustatymas parodė, kad ląstelėms būdinga 100 % CD90, CD73, CD105 žymenų raiška bei minimali ($\leq 1,5$ %) hematopoetinių CD34 (0,7 %), CD45 (0,24 %), CD14 (1,5 %) žymenų raiška (21 pav. B). Taip pat nustatyta, kad MKL diferencijavo į osteocitus, chondrocitus ir adipocitus, kai į terpę buvo pridėta specialių induktorių skatinančių MKL diferenciaciją *in vitro* sąlygomis. Osteocitai buvo vizualizuoti naudojant alizarino raudonąjį S

dažą, chondrocitai – toluidino mėlį, adipocitai – Oil Red O dažą (visi dažai iš Sigma-Aldrich, JAV) (21 pav. C).

Šiame darbe aprašytuose eksperimentuose naudotos 3-9 persėjimo MKL, vėlesnių persėjimų ląstelės nebuvo naudotos, dėl galimos spontaninės diferenciacijos rizikos.



21 pav. Odos MKL charakterizavimas. A – MKL, lendančios iš eksplanto po 7 dienų ir 12 dienų. Skalė – 200 μ m. B – MKL imunofenotipas. Raudonos histogramos – nežymėta kontrolė. Mėlynos – teigiama MKL žymenų raiška (CD73, D90, CD105), violetinė – neigiama hematopoetinių žymenų raiška (CD14, CD34, CD45). C – MKL diferenciacija osteogenine (alizarino raudonasis S), chondrogenine (toluidino mėlis) ir adipogenine (Oil Red O dažas) kryptimis. Skalė – 50 μ m.

3.3.3. Ląstelių kultivavimas

Vėžinės ląstelės buvo kultivuojamos ląstelių mitybinėje terpėje DMEM (*angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*), papildytoje 10 % jaučio embriono serumu bei 1 % antibiotikų penicilino ir streptomicino tirpalu (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) (visi iš Gibco, JAV). MKL buvo kultivuojamos DMEM terpėje, kuri buvo papildyta F12 maistinių medžiagų mišiniu (DMEM/F12, 3:1 v/v), 10 % jaučio embriono serumu ir 1 % antibiotikų penicilino ir streptomicino tirpalu. Taip pat ląstelių kultivavimui buvo naudojamas tripsinas 0,25 % (Biological Industries, Izraelis), fosfatinio buferio druskų tirpalas PBS pH 7,4 (Gibco, JAV) bei Dulbecco fosfatinio buferio druskų tirpalas, papildytas kalcio ir magnio druskomis (CaCl₂ ir MgCl₂) (*angl. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline – DPBS*) pH 7,4 (Sigma-Aldrich, JAV).

Ląstelės buvo auginamos 25 cm² arba 75 cm² kultivavimo flakonuose ir persėjamos 2-3 kartus per savaitę. Ląstelės visada buvo laikomos inkubatoriuje, pastovioje 37 °C temperatūroje, palaikant 5 % CO₂ koncentraciją ore. Visos manipuliacijos su ląstelėmis buvo atliekamos steriliomis sąlygomis, vertikalaus srauto laminare (NuAire, JAV). Eksperimento metu buvo naudojami sterilūs vienkartiniai įrankiai, o visos reikalingos priemonės ir reagentai buvo nupurkšti spiritu prieš įnešant į laminarą.

3.3.4. Nanodalelių kaupimosi ląstelėse tyrimai

Atliekant Au NK viduląstelinio susikaupimo tyrimus, MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės buvo sėjamos į 8 šulinėlių stiklinę plokštelę stikliniu dugnu (Lab-Tek, ThermoFisher, JAV), ląstelių tankis 3 · 10⁴ ląstelių į 300 µl. Vėliau ląstelės buvo 24 val. veikiamos 13,75 mg/ml Au NK tirpalu, praskiestu pilna mitybine terpe. Po inkubacijos, ląstelių branduoliai buvo nudažyti 0,01 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Vokietija) tirpalu. Au NK susikaupimas ląstelėse buvo analizuojamas konfokaliniu mikroskopu. Viso vaizdinimo metu ląstelės buvo laikomos mikroskopo inkubatoriuje (OkoLab, Italija), kuris palaikė pastovią 37 °C temperatūrą ir 5 % CO₂ koncentraciją (0,80 NI/min O₂ ir 0,04 NI/min CO₂).

Retųjų žemių metalų nanodalelių susikaupimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėse bei MKL buvo tiriamas fiksuotuose bandiniuose. Ląstelės buvo sėjamos į plokštelę su nuplėšiamais šulinėliais (ThermoFisher, JAV), po 3 · 10⁴ ląstelių į 300 µl. Vėliau ląstelės buvo 24 val. inkubuojamos su nanodalelėmis. Po inkubacijos ląstelės buvo fiksuotos 4 % paraformaldehido tirpalu (Sigma-

Aldrich, JAV). Ląstelių branduoliai buvo nudažyti 0,01 mg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Vokietija), o filamentinis aktinas buvo nudažytas 0,165 μ M Phalloidin-Alexa488 (ThermoFisher, JAV) fluorescenciniu dažu.

Tiek gyvi, tiek fiksuoti bandiniai buvo analizuojami naudojant Nikon Eclipse Te2000-S C1 Plus lazerinį skenuojantį konfokalinį mikroskopą (Nikon, Japonija) su diodiniu 404 nm lazeriu (Melles Griot, USA), argono 488 nm lazeriu (Melles Griot, USA) bei diodiniu 980 nm lazeriu (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., China). Vaizdinimas buvo atliktas naudojant 60 \times /1,4 skaitinės apertūros (SA) imersinį objektyvą (Nikon, Japonija). Buvo naudojamas trijų kanalų detektorius su filtrais (juostos pralaidumo filtrai 450/17, 545/45 ir 688/67 atitinkamai mėlyniems, žaliems ir raudoniems kanalams). Hoechst 33258 buvo žadinamas 404 nm, Au NK ir Phalloidin-Alexa488 fluorescencinis dažas buvo žadinti 488 nm, o retųjų žemių metalų nanodalelės – 980 nm.

Mikroskopijos vaizdų apdorojimas buvo atliktas naudojant Nikon EZ-C1 Bronze 3.80 versiją ir ImageJ 1.8.0_172 programinę įrangą.

3.3.5. Nanodalelių citotoksiškumo tyrimai

Nanodalelių citotoksiškumas buvo tiriamas naudojant laktatdehidrogenazės (LDH) nustatymo rinkinį (Thermo Scientific, JAV). LDH yra fermentas, randamas beveik visuose ląstelių tipuose. Kai ląstelės pažeidžiamos ar sunaikinamos, LDH išsiskiria į aplinką. Naudojamas rinkinys leidžia nustatyti kiek ląstelės, paveiktos nanodalelėmis, išskyrė LDH į mitybinę terpę, lyginant su kontrole.

Atliekant LDH citotoksiškumo testą, MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinės ląstelės buvo sėjamos į 96 šulinėlių plokštelę (BD Falcon, JAV), po $1,5 \cdot 10^4$ ląstelių viename šulinėlyje suspenduotų 150 μ l mitybinės terpės. Po 24 val. buvo nusiurbta mitybinė terpė ir užpilta 150 μ l naujos mitybinės terpės su tiriamomis nanodalelėmis. Į kontrolinius šulinėlius įpilta tik mitybinės terpės, be nanodalelių. Ląstelės buvo inkubuojamos 24 val. tamsoje, palaikant standartines sąlygas. Kitą dieną buvo naudojamas LDH citotoksiškumo tyrimo rinkinys (Thermo Scientific, JAV), siekiant nustatyti išsiskyrusį LDH. LDH nustatymo reakcija buvo vykdoma pagal gamintojo nurodytą protokolą, o LDH koncentracija buvo kiekybiškai įvertinta išmatuojant terpės optinį tankį ties 490 nm ir 630 nm bangos ilgiais su plokštelėms pritaikytu spektrofotometru (BioTek, JAV). Gavus optinio tankio vertes, jos buvo perskaičiuotos kaip citotoksiškumo procentinės vertės pagal protokolą. Siekiant geresnio duomenų pateikimo, įvertintas citotoksiškumas (%) buvo perskaičiuotas į ląstelių gyvybingumą (100 % – citotoksiškumas (%)).

Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis. Skirtumų tarp tirtų grupių statistinis reikšmingumas buvo įvertintas naudojant Stjudento t-testą 95 % pasiklovimo lygiu. Skirtumai buvo laikomi reikšmingi, kai $p < 0,05$.

3.3.6. Fotosensibilizacinio poveikio įvertinimas

FNT efektyvumas naudojant Au NK arba retųjų žemių metalų nanodaleles pirmiausiai buvo tiriamas ląstelių monosluoksniuose. MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelės buvo sėjamos į 8-šulinėlių plokšteles stikliniu dugnu (Lab-Tek, ThermoFisher, JAV). Viename šulinėlyje buvo užsėjama po $3 \cdot 10^4$ ląstelių į 300 μ l terpės. Po 24 val. buvo nusiurbiamą mitybinė terpė ir užpilama nauja mitybinė terpė su Au NK arba retųjų žemių metalų nanodalelėmis. Kontroliniuose šulinėliuose buvo tiesiog pakeičiama ląstelių mitybinė terpė. Ląstelės paliekamos 24 val. inkubatoriuje.

Kitą dieną ląstelės su Au NK buvo veikiamos ksenono lempa MAX-302 (Asahi Spectra, Japan), naudojant interferencinį filtrą (400/10 nm). Lempos apšvietimo galios tankis buvo 30 mW/cm², o švitinimo dozės nuo 20 J/cm² iki 60 J/cm².

Eksperimentuose su retųjų žemių metalų nanodalelėmis, ląstelės buvo veikiamos 980 nm lazerio spinduliuote. Priklausomai nuo eksperimento, lazerio galios tankis buvo 500 mW/cm² arba 900 mW/cm², o surinkta švitinimo dozė 450 J/cm² arba 900 J/cm².

Po švitinimo, nepriklausomai nuo to kurios dalelės buvo tiriamos, ląstelės buvo dedamos atgal į inkubatorių ir ten laikomos 24 val. Kitą dieną ląstelės buvo dažomos gyvybingumo dažais. Gyvos ląstelės buvo dažomos : kalceinu AM ($\lambda_{\text{zad}} = 488$ nm, Thermo Fisher, JAV), o negyvos – etidžio homodimeru-1 ($\lambda_{\text{zad}} = 543$ nm, Thermo Fisher, JAV) arba propidžio jodidu ($\lambda_{\text{zad}} = 543$ nm, ROTH, Vokietija). Nudažytos ląstelės buvo analizuojamos Nikon Eclipse konfokalinio mikroskopu (Nikon, Japonija). Naudotas 20 \times /0,5 SA sausas objektyvas (Nikon, Japonija).

Fotosensibilizacinis poveikis buvo kiekybiškai įvertintas skaičiuojant gyvybingas ir negyvybingas ląsteles iš gautų konfokalinių vaizdų, naudojant „ImageJ“ programinę įrangą. Vieno eksperimento metu gyvybingumui įvertinti buvo naudojami 5 konfokalinio mikroskopo nuotraukos. Ląstelių gyvybingumas buvo apskaičiuotas padalijus gyvybingų ląstelių skaičių iš visų ląstelių skaičiaus. Ląstelių gyvybingumo duomenys pateikti kaip 3-jų nepriklausomų eksperimentų vidutinės gyvybingumo reikšmės \pm standartinis nuokrypis. Statistinė analizė atlikta naudojant dvipusį Stjudento t-testą; skirtumai buvo laikomi reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3.3.7. Trimatės ląstelių kultūros formavimas

Trimatės sferoidinės ląstelių kultūros buvo formuojamos dviem metodais: kabančio lašo metodu, naudojant specialias 96-šulinėlių kabančio lašo plokšteles (Biomatrix, JAV) bei priverstinio plūduriavimo metodu, naudojant U-formos 96-šulinėlių plokšteles (Nunclon Sphera, Thermo Fisher Scientific, Japonija). Tyrimams su trimatėmis ląstelių kultūromis buvo naudojamos tik MDA-MB-231 ląstelės, kadangi MCF-7 ląstelės nesuformuoja tvirtų ląstelių sferoidų, tik ląstelių agregatus (Jarockyte ir kt., 2018).

Formuojant ląstelių sferoidus kabančio lašo principu, pirmiausia iš paruoštos ląstelių suspensijos kiekviename plokštelės šulinėlyje buvo formuojami kabantys lašai. Kiekvienas lašas buvo 40 μ l tūrio, viename suformuotame laše buvo 8000 ląstelių. Plokštelė, su suformuotais kabančiais lašais, buvo laikoma inkubatoriuje 7 dienas, pastovioje 37 °C temperatūroje, palaikant 5 % CO₂ koncentraciją ore. Siekiant užtikrinti pakankamą kiekį mitybinių medžiagų ląstelėms, kasdien kiekvienas lašas buvo papildomas 4 μ l šviežios pašildytos mitybinės terpės. Šiuo metodu formuoti sferoidai buvo nedideli, vidutiniškai 300 μ m skersmens. Tokio dydžio sferoido atstumas nuo paviršiaus iki centro neviršija maksimalaus atstumo, kuris dar leidžia audinius pilnai aprūpinti maisto medžiagomis ir deguonimi, todėl šiuose sferoiduose nėra nekrozinės zonos (Mehta ir kt., 2012).

Formuojant ląstelių sferoidus priverstinio plūduriavimo metodu, į sferoidų auginimo plokštelės kiekvieną šulinėlį buvo įpilama po 15000 MDA-MB-231 ląstelių, suspenduotų 200 μ l mitybinės terpės. Iš karto po to atliekamas centrifugavimas su mikroplokštelėms pritaikyta LMC-3000 centrifuga 6 min., 120 \times g (BioSan, Latvija). Sferoidai buvo formuojami 4 paras, plokštelę laikant standartinėmis ląstelių auginimo sąlygomis. Šiuo metodu suformuoti sferoidai buvo kur kas didesnio dydžio, sferoido skersmuo siekė 800-1000 μ m. Tokio dydžio sferoidai jau turi skirtingo ląstelių aktyvumo ir gyvybingumo zonas: proliferacinę, senėjimo ir nekrozinę (Hirschhaeuser ir kt., 2010).

3.3.8. Eksperimentai su ląstelių sferoidais

Tiriamą LiYF₄-Ce₆ susikaupimą MDA-MB-231 ląstelių sferoiduose, MDA-MB-231 ląstelių sferoidai buvo inkubuojami 24 val. su nanodalelėmis. Ląstelių branduoliai buvo dažomi 20 μ g/ml Hoechst 33258. Vėliau konfokalinio mikroskopo buvo vaizdinamas LiYF₄ bei LiYF₄-Ce₆ susikaupimas ir pasiskirstymas sferoide.

Siekiant nustatyti LiYF₄-Ce₆ kaip FS veikimą MDA-MB-231 sferoiduose, suformuoti sferoidai buvo 24 val. inkubuojami su LiYF₄-Ce₆ (kontroliniai sferoidai su LiYF₄) ir tuomet švitinami atkartojant sąlygas naudotas tyrimuose

su ląstelių monosluosniais. Praėjus 24 val. po švitinimo, ląstelių sferoidai buvo dažomi gyvybingumo dažais kalceinu ir etidžio homodimeru-1. Nudažyti sferoidai buvo vaizdinami konfokaliniu mikroskopu.

MKL migracijos MDA-MB-231 sferoide tyrimo metu, pirmiausiai buvo formuojamas MDA-MB-231 ląstelių sferoidas. Pilnai susiformavus sferoidui, buvo atliekamas sferoido dažymas su 20 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258, inkubuojant 24 val. Tuo pačiu metu Petri lėkštelėje MKL buvo inkubuojamos su 0,1 mg/ml LiLuF_4 nanodalelėmis 24 val., inkubacijos pabaigoje (likus 30 min) MKL yra dažomos su 2 μM kalceinu-AM (Thermo Fisher Scientific, JAV). Vėliau ant Hoechst 33258 pažymėto MDA-MB-231 sferoido pilama mitybinė terpė su MKL, santykiu 1:10 (MKL:MDA-MB-231), ląstelės paliekamos inkubatoriuje 24 val. Kontroliniai šulinėliai buvo inkubuojami su MKL be nanodalelių. Po inkubacijos sferoidai buvo vaizdinami konfokaliniu mikroskopu. MKL migracija sferoiduose buvo vertinama konfokaliniu mikroskopu, darant optinius pjūvius skirtingose plokštumose. Šie eksperimentai buvo planuojami remiantis Ferreira ir kt., 2021.

Siekiant įvertinti $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ fotodinaminę poveikį trimatėje ląstelių kultūroje, MDA-MB-231 ląstelių sferoidai buvo 24 val. inkubuojami su MKL, sukaupusiomis $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$. Kontroliniai sferoidai buvo inkubuojami 24 val. tik su 0,1 mg/ml $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ be MKL arba tik su MKL be nanodalelių. Po inkubacijos nanodalelės buvo nuplaunamos su DPBS ir atliekamas 1 arba 2 švitinimai bei ląstelių dažymas su kalceinu-AM ir propidžio jodidu. Švitinimas ir dažymas atliktas kaip aprašyta aukščiau su ląstelių monosluoksniu. Sferoidai buvo vaizdinami konfokaliniu mikroskopu.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirtos dviejų tipų nanodalelės – baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai bei retaisiais žemių metalais legiruotos nanodalelės ir jų kompleksai su fotosensibilizatoriumi chlorinu e_6 . Rezultatai gauti su skirtingomis nanodalelėmis aprašyti skirtinguose poskyriuose.

4.1. Baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai

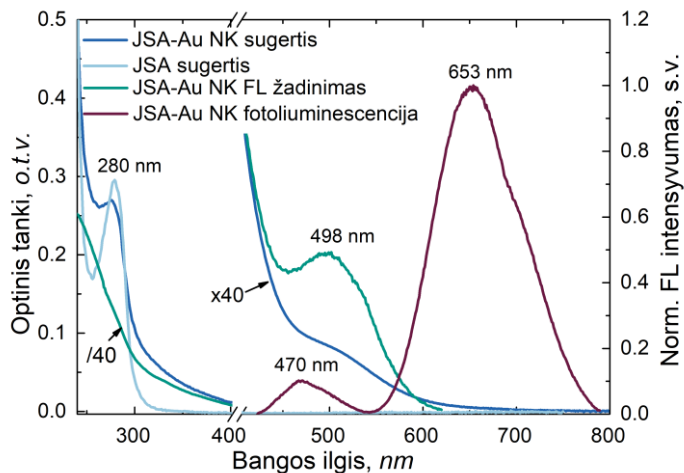
Doktorantūros metu buvo atliekami tyrimai su jaučio serumo albuminu stabilizuotais aukso nanoklasteriais (JSA-Au NK) bei žmogaus kraujo plazmos (0 grupės rezus teigiama (Rh^+) arba rezus neigiama (Rh^-)) baltymais stabilizuotais aukso nanoklasteriais (Rh^+ -Au NK ir Rh^- -Au NK). JSA-Au NK buvo pirmieji aprašyti baltymais stabilizuoti aukso klasteriai (Xie ir kt., 2009) ir dažnai naudojami įvairiuose biomedicininuose tyrimuose. Žmogaus kraujo plazmos baltymų panaudojimas Au NK stabilizavimui yra naujas Au NK sintezės metodas pirmą kartą aprašytas doktorantūros metu atspausdintoje publikacijoje (Jarockyte ir kt., 2022a).

Tyrimams buvo pasirinkta universaliausia kraujo grupė, t. y. 0 grupė, nes buvo siekiama išsiaiškinti ar galima sukurti universalius preparatus naudojant žmogaus kraujo plazmą. Taip pat buvo tiriama, ar turi įtakos rezus faktorius Au NK sintezei. Rh faktorius apibūdina eritrocitų paviršiaus Rh antigenų buvimą/nebuvimą. Rh^+ kraujo grupės eritrocitai turi transmembraninius baltymus, kurie priskiriami Rh antigenams, o Rh^- kraujo grupės eritrocitai – neturi. Jei Rh^- grupės pacientas perpylimo metu gautų Rh^+ grupės kraujo, susidarytų antikūnai prieš Rh antigenus ir įvyktų hemolizinė reakcija.

4.1.1. Aukso nanoklasterių charakterizavimas

Susintetintas JSA-Au NK koloidinis tirpalas dienos šviesoje buvo šviesiai rusvos spalvos, o po UV šviesa fotoluminescavo ryškia raudona spalva. Atlikus sintezę, pirmiausia buvo ištirtos JSA-Au NK spektrinės savybės: buvo išmatuoti sugerties, fotoluminescencijos (FL) ir FL žadinimo spektrai (22 pav.). Išmatuotas JSA-Au NK sugerties spektras yra panašus į JSA sugerties spektrą. Abiem spektrams būdinga juosta ties 280 nm ir optinio tankio didėjimas trumpabangėje srityje. 280 nm juosta yra būdinga aminorūgštims tirozinui ir triptofanui (Stenström ir Reinhard, 1925). Nustatyta, kad žadinant 405 nm spinduliuote yra stebima FL juosta su smaile ties 653 nm. Kadangi sintezei naudotos medžiagos ($H AuCl_4$, JSA) nepasižymi fluorescencija šioje srityje, ši juosta priskiriama pačio aukso nanoklasterio

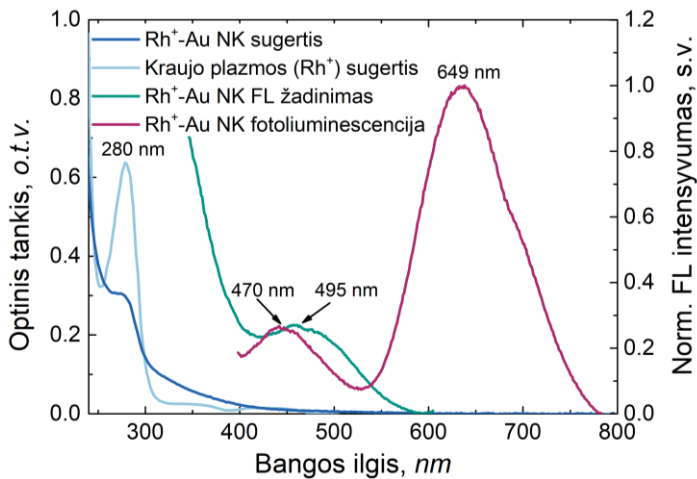
švytėjimui (Xie ir kt., 2009). Tačiau JSA-Au NK pasižymi ir fotoluminescencija ties 470 nm, ši FL juosta yra siejama su baltymų fluorescencija, kuri atsiranda dėl elektronų delokalizacijos peptidų grandinėje (Sarkar ir kt., 2014). JSA-Au NK fotoluminescencijos žadinimo spektras turi išsiskiriančią juostą ties 498 nm, o nuo 450 nm, trumpėjant bangos ilgiui, spektro intensyvumas smarkiai išauga. Lyginant su sugerties spektru, matome, kad FL žadinimo ir sugerties spektrai nesutampa – sugerties spektre yra tik neryškus petys ties 498 nm, o tai reiškia, kad sintezės metu susidarė ir nefotoluminescuojančių dalelių.



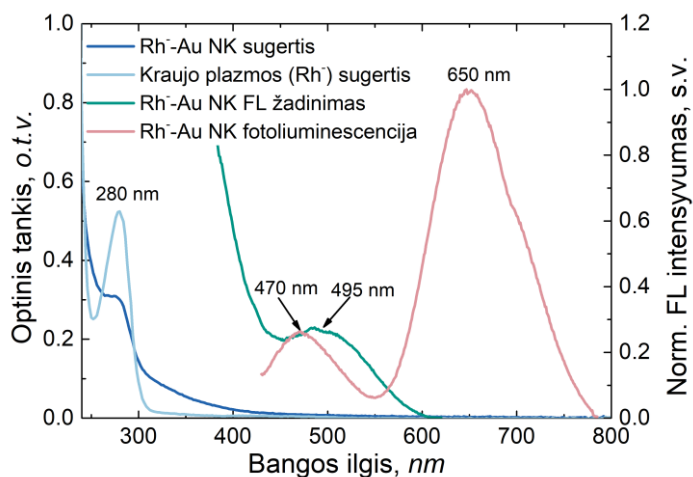
22 pav. JSA-Au NK spektrinės savybės distiliuotame vandenyje. Fotoluminescencija žadinta 405 nm, fotoluminescencijos žadinimo spektras matuotas ties 653 nm.

Išmatavus žmogaus kraujo plazmoje stabilizuotų aukso klasterių spektrus buvo gauti panašūs rezultatai. Au NK buvo sintetiniai 0 kraujo grupės plazmoje su arba be rezus faktoriaus (Rh^-). Tiek Rh^+ plazmoje sintetinti Au NK (Rh^+ -Au NK) (23 pav.), tiek Rh^- -Au NK (24 pav.) pasižymėjo vienodomis spektrinėmis savybėmis. Rh^+ ir Rh^- kraujo plazmos sugerties spektrai yra panašūs į gryno JSA sugerties spektrą, parodytą 22 pav. Yra nustatyta, kad žmogaus kraujo plazmoje apie 60 % visų baltymų sudaro žmogaus serumo albuminas. Albumino fiziologinė koncentracija plazmoje yra 35-50 g/l, o kitų baltymų, tokių kaip imunoglobulinai, fibrinogenas, transferinas ir kt., koncentracija yra daug mažesnė (Kratz ir Elsadek, 2012). ŽSA turi 585 amino rūgštis, o JSA – 582, tačiau abu albuminai yra panašūs savo sandara, atliekamomis funkcijomis ir spektrinėmis savybėmis (Chudzik ir kt., 2016). Plazmoje stabilizuotų Au NK FL ir FL žadinimo spektrai yra panašūs į JSA-Au NK atitinkamus spektrus savo forma ir smailių padėtimis. Be to, literatūroje buvo pastebėta, kad naudojant ir kitus baltymus ar jų mišinius susidaro dalelės pasižyminčiomis FL toje pačioje srityje. Li ir kt.

parodė, kad Au NK biosintezė yra įmanoma biologinėse terpėse, tokiose kaip kiaušinio baltymas ir trynys, veršiuko embriono, pelės ir žmogaus kraujo serumas (Li ir kt., 2015). Visose minėtose terpėse susintetinti Au NK pasižymėjo FL raudonoje srityje 633-663 nm, žadinant 470 nm. Autoriai padarė išvadą, kad nors keli skirtingi baltymai stabilizuoja Au NK sintezės metu, nes visos naudojamos terpės turi skirtingus baltymų rinkinius, tačiau albuminai vaidina pagrindinį vaidmenį formuojant Au NK ir dėl to gaunamos panašias optines savybes turinčios nanodalelės (Li ir kt., 2015). Remiantis spektriniais matavimais ir literatūros duomenimis, tikėtina, kad naudojant žmogaus kraujo plazmą Au NK sintezėje, pagrindinį vaidmenį taip pat atlieka ir spektrines savybes nulemia ŽSA.

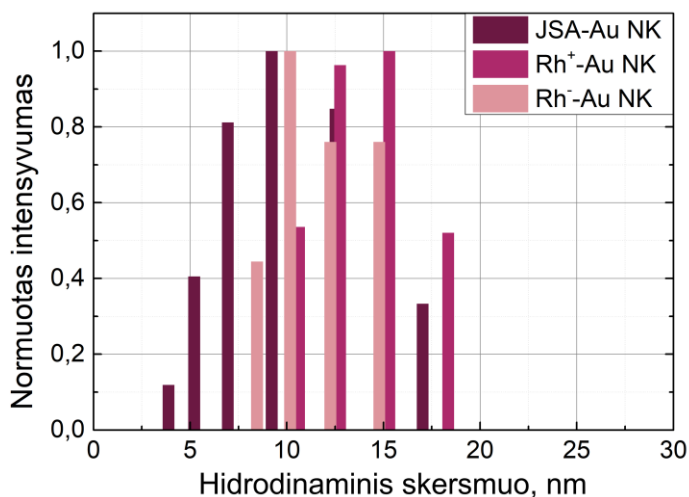


23 pav. Rh⁺-Au NK spektrinės savybės distiliuotame vandenyje. Fotoluminescencija žadinta 405 nm, fotoluminescencijos žadinimo spektras matuotas ties 649 nm.



24 pav. Rh⁻-Au NK spektrinės savybės distiliuotame vandenyje. Fotoluminescencija žadinta 405 nm, fotoluminescencijos žadinimo spektras matuotas ties 650 nm.

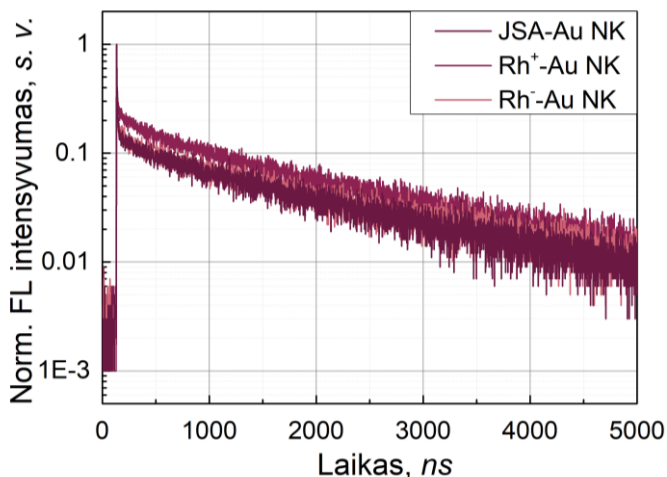
Norint nanodaleles pritaikyti biomedicinoje, labai svarbu ištirti dydį, nuo kurio priklauso prasiskverbimas iš kraujotakos į audinius, patekimas į ląsteles, toksiškumas ir vėliau pašalinimas iš organizmo. Šiame tyrime buvo pasirinkta matuoti hidrodinaminį Au NK dydį tirpaluose, kadangi taikant kitus metodus, tokius kaip atomo jėgos arba elektroninę mikroskopijas, reikėtų išdžiovinti bandinį ir galimai būtų pažeista baltyminė klasterio dalis. Visų trijų ištirtų Au NK hidrodinaminio skersmens matavimo rezultatai yra pateikti 25 pav.



25 pav. Susintintų aukso nanoklasterių hidrodinaminio skersmens pasiskirstymas distiliuotame vandenyje. Hidrodinaminis skersmuo išmatuotas dinaminės šviesos sklaidos metodu.

Atlikti matavimai parodė, JSA-Au NK hidrodinaminis skersmuo yra $9,4 \pm 2,5$ nm. Iš ankstesnių tyrimų yra žinoma, kad JSA molekulių hidrodinaminis skersmuo yra $7,2 \pm 1,2$ nm (Poderys ir kt., 2016), o pačio 25-ių Au atomų nanoklasteris baltymo viduje dydis nesiekia 1 nm (Xie ir kt., 2009). Sintezės metu Au NK susidarymas pakeičia JSA konformaciją, kuri ir nulemia dydžio pokyčius (Xie ir kt., 2009; Poderys ir kt., 2016).

Žmogaus kraujo plazmoje sintetintų Au NK vidutinis skersmuo buvo apie 12 nm – t. y. šiek tiek didesnis nei JSA-Au NK. Matavimų metu buvo nustatyta, kad Rh⁺-Au NK hidrodinaminis skersmuo yra $13,3 \pm 2,9$ nm, o Rh⁻-Au NK skersmuo yra $11,2 \pm 2,4$ nm. Nanoklasterių skersmuo buvo panašaus dydžio nepriklausomai nuo to ar sintezėje naudota Rh⁺ kraujo plazma, ar Rh⁻. Literatūroje aprašyta, kad ŽSA vidutinis hidrodinaminis skersmuo yra 7 nm, o juo stabilizuotų Au NK skersmuo padidėja iki 12 nm (Russell ir kt., 2016). Tad šiuo atveju, nors sintezėje buvo naudotas baltymų mišinys, žmogaus plazmoje susidarę nanoklasteriai yra tokio paties dydžio kaip ir gryname ŽSA sintetintų Au NK.



26 pav. Aukso nanoklasterių fotoluminescencijos juostos ties 650 nm gyvavimo trukmių kinetikos.

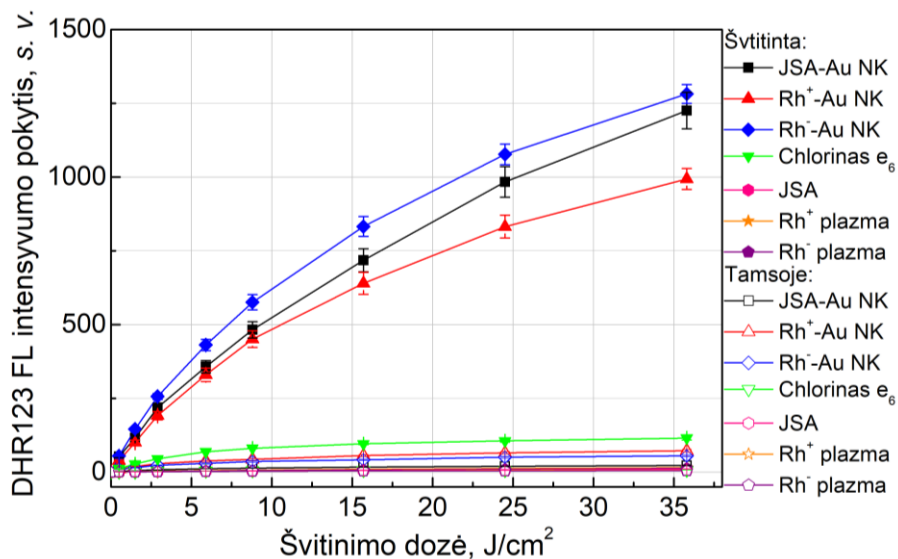
Papildomai buvo išmatuota FL gesimo trukmė Au NK žadinant 405 nm (26 pav.). Visų matuotų bandinių FL gesimo kinetikos, matuojant FL ties 650 nm, sutapo. Panaudojant trijų eksponenčių gesimo modelį, buvo nustatyta trumpa ($\tau_1 = \sim 5$ ns), vidutinė ($\tau_2 = \sim 200$ ns) ir ilga ($\tau_3 = \sim 1,7$ μ s) gyvavimo trukmės. Šis rezultatas labai panašus į literatūroje aprašytą JSA-Au NK FL gesimo kinetiką (Yu ir kt., 2012). Minėtoje publikacijoje JSA-Au NK trumpoji gesimo komponentė buvo susieta su greita Au NK fotoluminescencija albumino aplinkoje, o ilgoji komponentė – su uždelstąja JSA-Au NK fotoluminescencija (Yu ir kt., 2012). Remiantis šiuo paaiškinimu, didžioji dalis sužadavimo energijos (>90 %) yra atpalaiduojama uždelstosios fotoluminescencijos proceso metu. Vadinasi baltymais stabilizuoti Au NK gana ilgai išlieka sužadintoje būsenoje. Tai sudaro labai palankias sąlygas įvairių aktyvių deguonies formų susidarymui.

4.1.2. Aktyvių deguonies formų generavimo tyrimas

Norint įvertinti Au NK gebėjimą generuoti aktyvias deguonies formas, buvo pasirinkti du fluorescenciniai jutikliai: SOSG (angl. *singlet oxygen sensor green*), kuris yra skirtas $^1\text{O}_2$ aptikimui ir DHR123 (dihidrorodaminas 123, angl. *dihydrorhodamine 123*) – peroksidų ir peroksinitritų aptikimui. Gerai žinomas fotosensibilizatorius Ce_6 buvo naudojamas kaip teigiama kontrolė ROS susidarymo kiekiui įvertinti. Yra žinoma, kad švitinimo metu porfirinų tipo FS, tokie kaip Ce_6 , pagrinde generuoja $^1\text{O}_2$ ir tik labai nedidelį kiekį kitų aktyvių deguonies formų (Fuchs ir Thiele, 1998). 27 pav. parodytas DHR132 fluorescencijos juostų intensyvumo kitimas priklausomai nuo

švitinimo dozės. Tiriamieji mėginiai buvo apšviečiami 405 nm spinduliuote. Kontroliniai bandiniai buvo laikomi tamsoje.

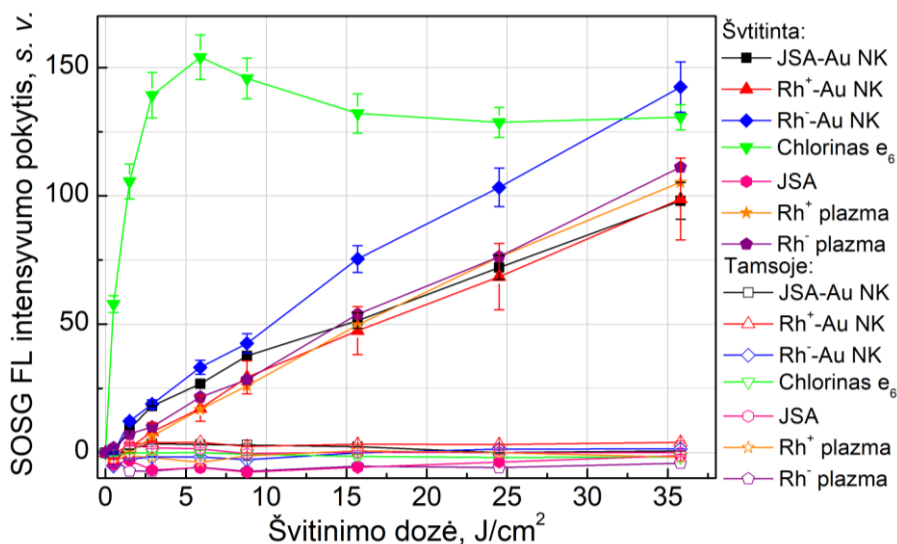
Kaip pateikta 27 pav., DHR123 fluorescencijos intensyvumo padidėjimas buvo stebimas mėginiuose su JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK bei Rh⁻-Au NK, kurie buvo apšviesti 405 nm šviesa. Didžiausias fluorescencijos intensyvumo pokytis buvo stebimas bandiniuose su Rh⁻-Au NK, šiek tiek mažesnis bandiniuose su JSA-Au NK, trečioje vietoje – su Rh⁺-Au NK. DHR123 fluorescencijos intensyvumo augimas rodo peroksidų ir peroksinitritų susidarymą. Tamsoje laikytuose bandiniuose DHR123 fluorescencijos intensyvumas nepadidėjo. Tai rodo, kad tamsoje ROS nesusidaro. DHR123 fluorescencija tik šiek tiek padidėjo po švitinimo ta pačia doze mėginiuose su vien Ce₆ arba Rh⁺/Rh⁻ plazma (27 pav.). Bandiniuose, kuriuose buvo tik JSA, DHR123 fluorescencijos augimas nebuvo stebimas. Tamsoje laikomuose bandiniuose taip pat nebuvo fiksuotas DHR123 fluorescencijos intensyvumo augimas.



27 pav. DHR123 fluorescencijos intensyvumo augimas priklausomai nuo švitinimo dozės. Bandiniai buvo švitinami 405 nm lazerio spinduliuote iki 35,7 J/cm² dozės. Kontroliniai bandiniai buvo laikomi tamsoje. Paklaidos rodo standartinį nuokrypį.

SOSG fluorescencijos intensyvumas padidėjo visuose švitintuose bandiniuose, išskyrus bandinius su JSA (28 pav.). Fluorescencijos intensyvumo augimo greitis buvo skirtingas, o tai rodo, kad skirtingiems mėginiams ¹O₂ susidarymo efektyvumas skiriasi. 28 pav. parodyta, kad Ce₆ labai greitai generuoja ¹O₂, palyginti su Au NK, tačiau pasiekus 35,7 J/cm² švitinimo dozę, bendras susidariusio ¹O₂ kiekis yra labai panašus visuose

bandiniuose, kuriuose susidarė $^1\text{O}_2$. Iš bandinių su Au NK, daugiausiai $^1\text{O}_2$ susidarė bandiniuose su Rh⁻-Au NK. Tačiau buvo pastebėta, kad žmogaus plazma taip pat generuoja $^1\text{O}_2$ veikiant 405 nm. Tai gali būti nesunkiai paaiškinama endogeninių fotosensibilizatorių, tokių kaip uroporfirinas, koproporfirinas ir protoporfirinas, buvimu plazmoje (With, 1977). Šie endogeniniai porfirinai, taip pat kaip ir Ce₆ didžiąja dalimi generuoja $^1\text{O}_2$, o ne kitas aktyvias deguonies formas. Kadangi susidariusio $^1\text{O}_2$ kiekis pačioje plazmoje panašus į tą, kuris susidarė bandiniuose su Au NK, panašu, kad patys Au NK labai silpnai generuoja $^1\text{O}_2$ švitinimo metu.



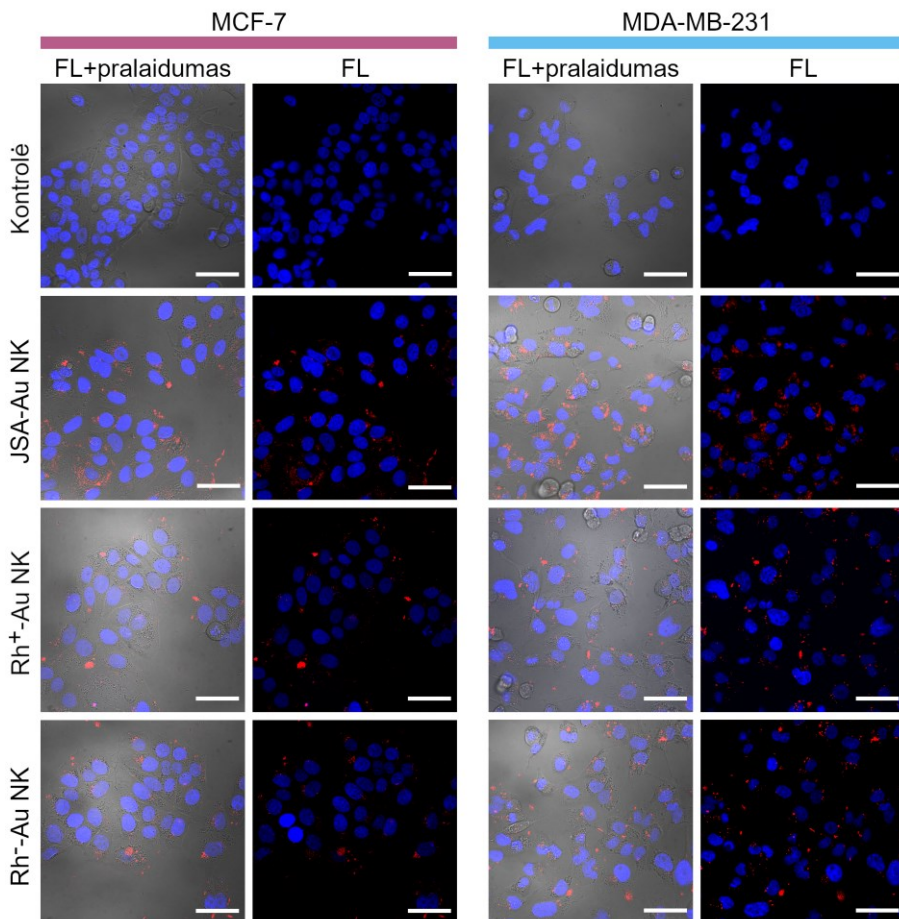
28 pav. SOSG fluorescencijos intensyvumo kitimas priklausomai nuo švitinimo dozės. Bandiniai buvo švitinami 405 nm lazerio spinduliuote iki 35,7 J/cm² dozės. Kontroliniai bandiniai buvo laikomi tamsoje. Paklaidos rodo standartinį nuokrypį.

Taigi, mūsų tyrimai parodė, kad plazmos baltymais stabilizuoti Au NK gali generuoti ROS, kai yra apšviečiami 405 nm šviesa. Be to, nustatėme, kad Au NK efektyviau generuoja ne $^1\text{O}_2$, kaip porfirinų tipo FS, o kitus ROS, pavyzdžiui, peroksidus, ir RNR, pavyzdžiui, peroksinitritus.

4.1.3. Susikaupimas vėžinėse ląstelėse

Siekiant sėkmingai pritaikyti Au NK vėžio diagnostikai ir gydymui, pirmiausia reikia iširti ar susintetinti Au NK kaupiasi ląstelėse. Ląsteliniams tyrimams buvo pasirinktos dvi krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7 ir MDA-MB-231. Šios ląstelių linijos skiriasi piktybiškumu ir atsaku į gydymą: MDA-MB-231 ląstelės laikomos atsparesnėmis gydymui, labiau linkusiomis

metastazuoti, todėl kai kuriuose literatūros šaltiniuose vadinamos vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis (Liu ir kt., 2013b).



29 pav. Aukso nanoklasterių susikaupimas MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties vėžinėse ląstelėse po 24 val. inkubacijos. Au NK ($\lambda_{\text{žad}} = 488 \text{ nm}$) pažymėti raudona spalva. Ląstelių branduoliai nudažyti Hoechst 33258 ($\lambda_{\text{žad}} = 405 \text{ nm}$), pažymėti mėlyna spalva. Skalė visuose nuotraukose atitinka $50 \mu\text{m}$.

29 pav. yra pateikti konfokalinės fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, kuriuose matomas JSA-Au NK, Rh^+ -Au NK ir Rh^- -Au NK (raudona spalva) susikaupimas krūties vėžinėse ląstelėse. Pateiktuose vaizduose matosi, kad visi minėti Au NK po 24 val. inkubacijos susikaupia abiejose ląstelių linijose ir ženklaus skirtumo tarp kaupimosi skirtingose ląstelių linijose nėra matyti. Iš kombinuotų konfokalinės fluorescencijos ir šviesos pralaidumo mikroskopijos vaizdų galime teigti, kad Au NK (raudona spalva) buvo susikaupę ląstelėse, paprastai šalia branduolių (mėlyna spalva), bet ne branduolių viduje. Au NK nebuvo pasiskirstę tolygiai ląstelės viduje, buvo

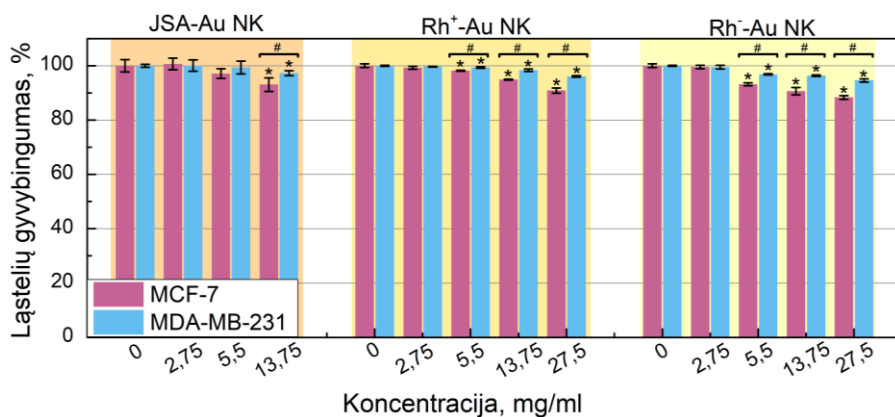
stebimas susitelkimas tam tikrose ląstelių struktūrose, membraninėse pūslelėse, tokiose kaip endosomos ar lizosomos. Ankstesniuose tyrimuose buvo nustatyta, JSA-Au NK patekę į MCF-7 ir MDA-MB-231 ląsteles pirmiausia patenka į ankstyvasias endosomas, vėliau į vėlyvasias endosomas ir lizosomas, taigi į ląsteles patenka endocitozės būdu (Matulionyte ir kt., 2017). Lipoinė rūgštimi stabilizuoti Au NK į HeLa ląsteles patenka pagrinde nuo klitrino priklausomos endocitozės bei makropinocitozės būdu, o nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu patenka tik nedidelė dalis nanodalelių (Yang ir kt., 2013).

4.1.4. Biosuderinamumas

Konfokalinės mikroskopijos vaizdai neparodė akivaizdžių ląstelių morfologijos pokyčių. Tačiau siekiant įsitikinti, kad tiriami Au NK yra biosuderinami, buvo atliktas ląstelių gyvybingumo tyrimas. Ląstelės buvo inkubuojamos su skirtingų koncentracijų Au NK tirpalais tamsoje. Po 24 val. inkubacijos, naudojant citotoksiškumo tyrimo rinkinį, buvo vertinamas Au NK poveikis ląstelių gyvybingumui, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis. Kaip parodyta 30 pav., mažiausia naudota koncentracija (2,75 mg/ml) neturėjo jokios įtakos ląstelių gyvybingumui, nepriklausomai nuo to, kokie Au NK buvo naudojami. Po inkubacijos 5,5 mg/ml tirpalais, JSA-Au NK neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio ląstelių gyvybingumui, o inkubuojant su Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK buvo pastebėtas tik nedidelis ląstelių gyvybingumo sumažėjimas. Padidinus Au NK koncentraciją iki 13,75 mg/ml, visose grupėse ląstelių gyvybingumas išlieka didesnis nei 90 %, tačiau MCF-7 ląstelės buvo labiau paveiktos, palyginti su MDA-MB-231 ląstelėmis. Tačiau net veikiant 27,5 mg/ml koncentracijos Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK, ląstelių gyvybingumas išlieka apie 90 %. Šie rezultatai rodo, kad tirti Au NK yra netoksiški MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms tamsoje.

Literatūroje yra aprašyta nemažai tyrimų, kurių metu siekiama įvertinti baltymais stabilizuotų Au NK poveikį ląstelių gyvybingumui. Daugiausiai tyrimų yra atlikta su JSA-Au NK ir dauguma tyrimų rodo, kad JSA-Au NK yra netoksiški (Ungor ir kt., 2021; Zhang ir kt., 2020; Escudero-Francos ir kt., 2017). Tačiau keletas autorių yra parodę, kad JSA-Au NK gali sukelti nedidelį toksišką poveikį ląstelėms (Czyżowska ir kt., 2021; Dong ir kt., 2015; Retnakumari ir kt., 2010). Šie prieštaravimai galėjo atsirasti dėl tyrimams pasirinktų skirtingų metodų ar bei naudojamų protokolų. Ungor ir kt. parodė, kad atliekant tyrimus su tomis pačiomis nanodalelėmis, tačiau skirtingais metodais, kai kuriais atvejais yra gaunami skirtingi toksiškumo rezultatai

(Ungor ir kt., 2021). Bet kuriuo atveju, stebimi skirtumai nėra labai dideli ir gali atsirasti dėl naudojamo metodo ar eksperimentų paklaidų.



30 pav. MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po 24 val. poveikio su JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK. Išmatuota naudojant LDH citotoksiškumo tyrimo rinkinį. Paklaidos rodo standartinę nuokrypį. * pažymėta statistiškai patikimi skirtumai lyginant su kontrole, # rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių ($p < 0,05$).

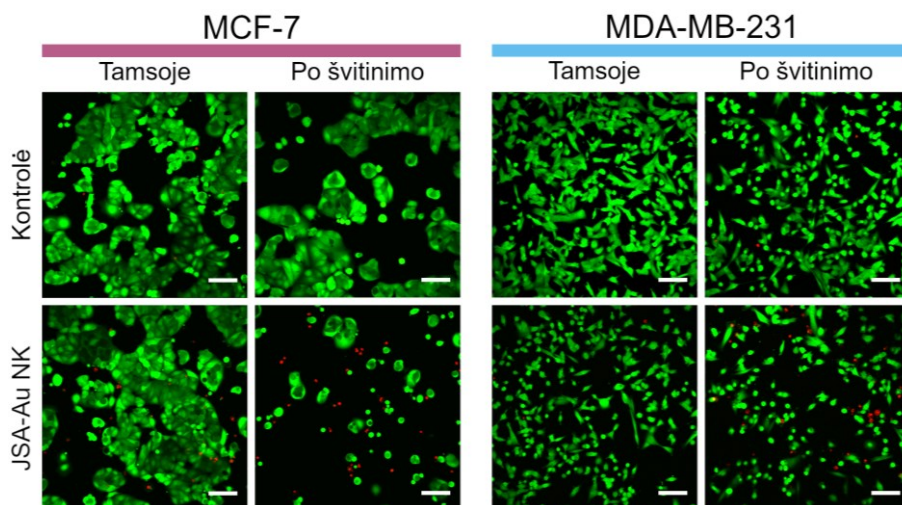
Su žmogaus kraujo plazmoje sintetintais Au NK anksčiau tyrimų nebuvo atlikta. Tačiau yra publikacijų, kuriose tiriamas ŽSA-Au NK toksiškumas. Ungor ir kt. naudodami LDH nustatymo metodą parodė, kad COLO-720L ląstelių gyvybingumas sumažėjo tik 5 % po inkubacijos su 25, 50 ir 75 mg/l ŽSA-Au NK tirpalais. Be to, atlikus tą patį tyrimą su HUT-78 ląstelėmis citotoksiškumo nepastebėta ir ląstelių gyvybingumas išliko nepakitęs lyginant su kontrole (Ungor ir kt., 2021). Kita vertus, Chakraborty ir kt. nustatė, kad MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas sumažėjo 50 % po poveikio su 50 μ M ŽSA-Au NK (Chakraborty ir kt., 2021). Li ir kt. ištyrė Au NK, stabilizuotų kiaušinio baltymu ir jaučio embriono serumo baltymais, citotoksiškumą ir nepastebėjo jokio poveikio ląstelių gyvybingumui (Li ir kt., 2015).

4.1.5. Fotodinaminis poveikis vėžinėms ląstelėms

Siekiant įvertinti Au NK fotodinaminį poveikį vėžinėms ląstelėms, MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės buvo inkubuojamos su JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK arba Rh⁻-Au NK ir apšviečiamos mėlyna šviesa (naudotas 400/10 nm interferencinis filtras, galios tankis 30 mW/cm²). Fotodinaminio poveikio tyrimui buvo pasirinkta 400/10 nm šviesa, nes tokio bangos ilgio FL sužadimas yra efektyvesnis, o mėlynos šviesos prasiskverbimo į ląstelių monosluoksnius pakanka, tačiau *in vivo* taikymams, siekiant didesnio prasiskverbimo gylio, reikėtų rinktis ilgabangę šviesą. Kadangi Au NK

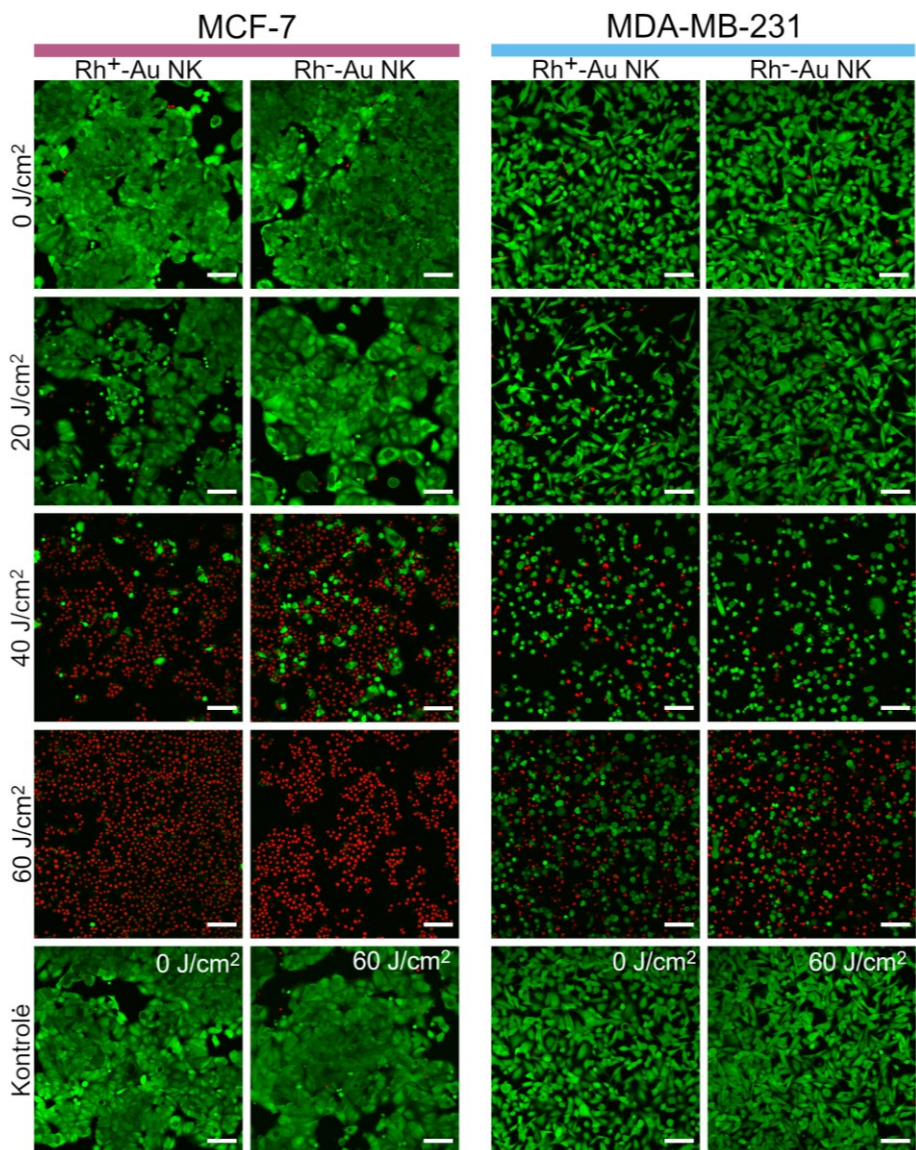
pasižymi plačiomis FL sužadavimo juostomis, juos galima sužadinti ir žalia ar oranžine šviesa.

Pirmiausiai buvo atliekami tyrimai su JSA-Au NK. Ląstelės buvo 24 val. inkubuojamos su 13,75 mg/ml JSA-Au NK, vėliau terpė su nanoklasteriais pašalinama ir užpilama nauja terpė be nanoklasterių. Tuomet dalis bandinių buvo apšviečiami 400/10 nm šviesa iki 35,7 J/cm² šviesos dozės. Likusi dalis bandinių buvo laikomi tamsoje, suvynioti į aliuminio foliją, tačiau visos kitos eksperimento sąlygos buvo išlaikomos vienodos. Po 24 val. ląstelės buvo nudažomos fluorescenciniais gyvybingumo dažais ir tuomet atliekamas vaizdinimas konfokaliniumi mikroskopu. Gauti rezultatai pateikti 31 pav. Kontrolinių ląstelių gyvybingumas nepriklausė nuo to ar ląstelės buvo laikytos tamsoje, ar buvo apšviestos mėlyna šviesa.



31 pav. JSA-Au NK (13,75 mg/ml, 24 val.) fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms po švitinimo 400/10 nm šviesa iki 35,7 J/cm² dozės. Ląstelės buvo nudažytos fluorescenciniais gyvybingumo dažais: gyvoms ląstelėms vizualizuoti buvo naudojamas kalceinas AM (žalias), o mirusioms ląstelėms vizualizuoti – propidžio jodidas (raudonas). Skalė visuose vaizduose atitinka 50 μm.

Atliekant tyrimus su kraujo plazmoje sintetintais Au NK, buvo išbandytos skirtingos švitinimo dozės, siekiant išsiaiškinti optimalias švitinimo sąlygas ir nustatyti, ar fotodinaminis poveikis priklauso nuo dozės. Po švitinimo ląstelės taip pat buvo nudažytos fluorescenciniais gyvybingumo dažais kalceinu AM ir propidžio jodidu. Gauti rezultatai pateikti 32 pav. Pastebėta, kad po 20 J/cm² švitinimo dozės MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės išliko gyvybingos (žalia spalva, 32 pav.), tačiau pakito kai kurių ląstelių morfologija: jos suapvalėjo ir dalinai atsiskyrė nuo mikroskopinės plokštelės paviršiaus. Apšviestas ląsteles

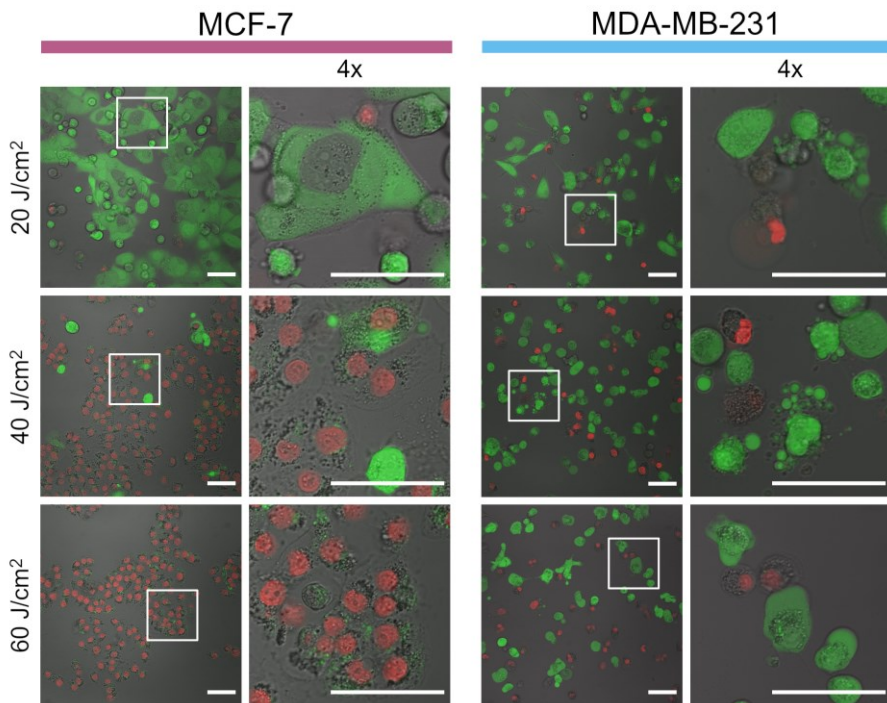


32 pav. Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK (13,75 mg/ml, 24 val.) fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms po švitinimo 400/10 nm šviesa. Ląstelės buvo nudažytos fluorescenciniais gyvybingumo dažais: gyvoms ląstelėms vizualizuoti buvo naudojamas kalceinas AM (žalias), o mirusioms ląstelėms vizualizuoti – propidžio jodidas (raudonas). Skalė visuose vaizduose atitinka 50 μm.

40 J/cm² švitinimo doze, MCF-7 ląstelių gyvybingumas ženkliai sumažėjo, dauguma ląstelių buvo negyvybingos (raudona spalva, 32 pav.). Kita vertus, dauguma MDA-MB-231 ląstelių išliko gyvybingos, nors beveik visos ląstelės suapvalėjo arba turėjo apoptozei būdingą morfologiją. Kaip parodyta 32 pav., visos MCF-7 ląstelių buvo negyvybingos po 60 J/cm² švitinimo dozės, tuo tarpu tik maždaug pusė MDA-MB-231 ląstelių buvo negyvybingos, tačiau

likusios ląstelės taip pat buvo paveiktos ir pasikeitė jų morfologija, ji tapo panaši į apoptuojančioms ląstelėms būdingą morfologiją. Švitinimas tiek Rh⁺-Au NK, tiek Rh⁻-Au NK turėjo panašų poveikį ląstelėms, vizualiai skirtumo tarp šių nanoklasterių poveikio nebuvo pastebėta. Kontrolinių dalelių (be Au NK) gyvybingumas eksperimento metu nepakito nepriklausomai nuo švitinimo dozės.

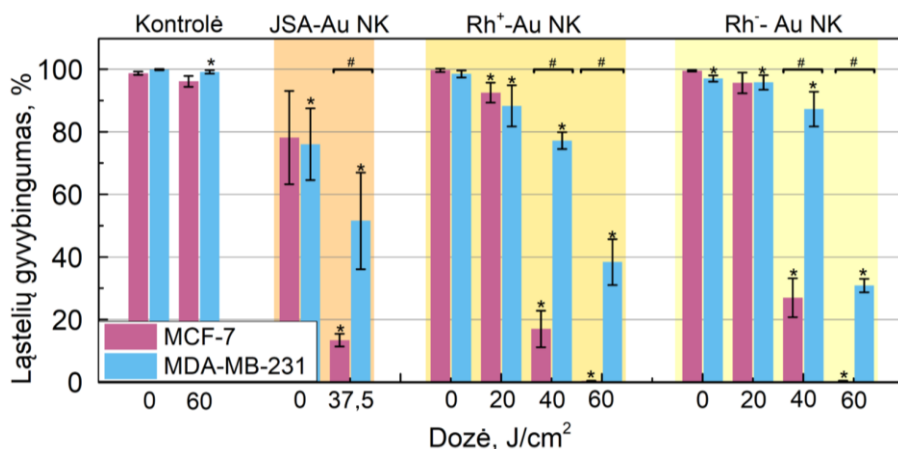
Siekiant detaliau panagrinėti ląstelių morfologinius pokyčius po švitinimo, ląstelės buvo vaizdinamos didesniu didinimu ir papildomai fiksuojami šviesos pralaidumo vaizdai (33 pav.). Net ir po mažiausios dozės, 20 J/cm², pakito kai kurių ląstelių morfologija. Kaip matyti 32 pav., kai kuriose ląstelėse atsiranda pūslelių ir galima pastebėti apoptozei būdingus morfologinius pokyčius (Van Cruchten ir Van den Broeck, 2002). Po 40 J/cm² švitinimo dauguma MCF-7 ląstelių žūsta, tačiau dauguma MDA-MB-231 vis dar gyvos (nusidažė kalceinu – žalia spalva), tačiau pasikeitė jų morfologija: beveik visos ląstelės prarado joms būdingą formą ir tapo apvalios.



33 pav. Rh⁺-Au NK (13,75 mg/ml, 24 val.) fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms po švitinimo 400/10 nm šviesa. Ląstelės buvo nudažytos fluorescenciniais gyvybingumo dažais: gyvoms ląstelėms vizualizuoti buvo naudojamas kalceinas AM (žalias), o mirusioms ląstelėms vizualizuoti – propidžio jodidas (raudonas). Skalė visuose vaizduose atitinka 50 μm.

34 pav. yra pateikiamas kiekybinis Au NK fotodinaminio poveikio MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms įvertinimas. Ląstelių be nanoklasterių gyvybingumas po švitinimo 60 J/cm² doze išliko nepakitęs ir apskaičiuotas MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas buvo daugiau nei 96 %. Taip pat ir ląstelių, kurios buvo inkubuojamos su Rh⁺-Au NK arba Rh⁻-Au NK, bet nebuvo apšvitintos 400/10 nm šviesa, gyvybingumai nepasikeitė ir jų gyvybingumas išliko 97 % ar didesnis. Šie tiek sumažėjo gyvybingumas ląstelių, kurios buvo inkubuotos su JSA-Au NK: MCF-7 ląstelių gyvybingumas nukrito iki 78 %, o MDA-MB-231 – iki 76 %.

Ląsteles, kurios buvo inkubuotos su JSA-Au NK, paveikus 400/10 nm šviesa iki 35,7 J/cm² dozės, buvo stebimas ženklus ląstelių gyvybingumo sumažėjimas. MCF-7 ląstelių gyvybingumas nukrito iki 13 %, tuo tarpu MDA-MB-231 ląstelių – iki 52 %.



34 pav. Kiekybinis JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms, po švitinimo 400/10 nm šviesa. Paklaidos žymi standartinius nuokrypius. Grafike pažymėti statistškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis (*, p < 0,05); # rodo reikšmingus skirtumus tarp MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijų (p < 0,05).

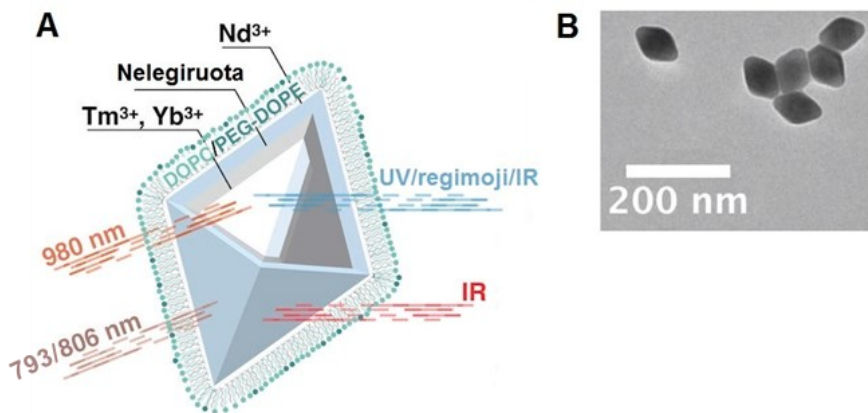
Atlikus tyrimus su kraujo plazmoje sintetintais Au NK, buvo stebima ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo švitinimo dozės. Apšvietus ląsteles 20 J/cm² doze, ląstelių, inkubuotų su Rh⁺-Au NK arba Rh⁻-Au NK, gyvybingumas šiek tiek sumažėja. Šiek tiek didesnę poveikį ląstelių gyvybingumui turėjo Rh⁺-Au NK (MCF-7 – 93 %, MDA-MB-231 – 88 %), lyginant su Rh⁻-Au NK (abiejų ląstelių linijų 96 %). Tačiau statistinė analizė neparodė jokių statistškai reikšmingų skirtumų tarp ląstelių gyvybingumų, lyginant Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK poveikį. Padidinus švitinimo dozę iki 40 J/cm², ląstelių gyvybingumas pradėjo ženkliai mažėti. Pirmiausia, tiek Rh⁺-Au NK, tiek Rh⁻-Au NK turėjo didesnę fototoksinę poveikį MCF-7

ląstelėms nei MDA-MB-231 ląstelėms. MCF-7 ląstelių gyvybingumas po švitinimo 40 J/cm^2 doze sumažėjo iki 17 % ir 27 %, kai ląstelės prieš švitinimą buvo inkubuotos atitinkamai su Rh^+ -Au NK ir Rh^- -Au NK. Po 60 J/cm^2 poveikio visos MCF-7 ląstelės buvo negyvos. Tuo tarpu MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po švitinimo 40 J/cm^2 doze išliko 77 % ir 87 %, kai ląstelės buvo prieš tai paveiktos atitinkamai su Rh^+ -Au NK ir Rh^- -Au NK. Po didesnės dozės (60 J/cm^2) išgyveno 38 % (Rh^+ -Au NK) ir 31 % (Rh^- -Au NK) MDA-MB-231 ląstelių. Taigi, MDA-MB-231 ląstelės buvo atsparesnės fotodinaminiam poveikiui nepriklausomai nuo to, kurie Au NK buvo naudoti.

Šiuo metu yra atspausdinti tik keli straipsniai, kuriuose buvo tiriamas Au NK fototoksiškumas, tačiau dėl pačių Au NK skirtumų (skirtingo padengimo, dydžio) bei taikomų eksperimentinių metodų skirtumų ar nepakankamos informacijos apie juos (pavyzdžiui, švitinimo dozės, naudojamos šviesos galios tankis), sunku objektyviai palyginti gautus rezultatus su kitų autorių darbais.

4.2. Retųjų žemių metalų nanodalelių ir chlorino e_6 kompleksai

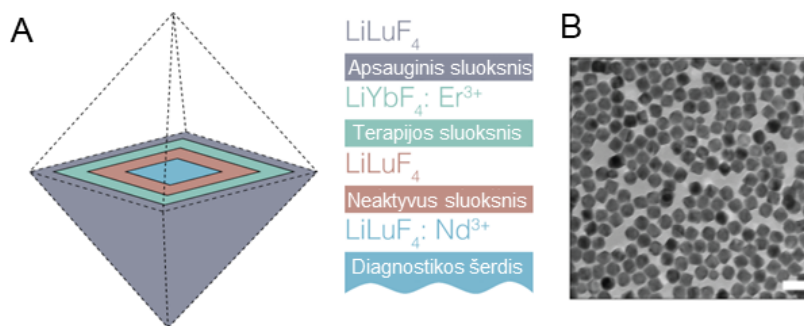
Šiame darbe tiriamos dviejų tipų retaisiais žemių metalais legiruotos nanodalelės ir jų kompleksai su Ce_6 . Pirmiausia buvo tiriamos trisluoksnės $\text{LiYF}_4:\text{Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}@\text{LiYF}_4@\text{LiYF}_4:\text{Nd}^{3+}$ nanodalelės (toliau trumpinama LiYF_4), vėlesni tyrimai atlikti su keturių sluoksnių $\text{LiLuF}_4:\text{Nd}^{3+}@\text{LiLuF}_4@\text{LiYbF}_4:\text{Er}^{3+}@\text{LiLuF}_4$ nanodalelėmis (toliau trumpinama LiLuF_4).



35 pav. A) $\text{LiYF}_4:\text{Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}@\text{LiYF}_4@\text{LiYF}_4:\text{Nd}^{3+}$ nanodalelės, sudarytos iš branduolio ir dviejų apvalkalų bei padengtos DOPC/PEG-DOPE fosfolipidais, schema. Žadinant nanodalelę 980 nm spinduliuote, šerdyje vyksta apkonversijos procesas ir yra išspinduliuojama UV, regimoji ir IR spinduliuotė. Žadinant 793 nm arba 806 nm spinduliuote, apkonversija nevyksta, emituojama IR spinduliuotė. B) LiYF_4 nanodalelių vaizdas užfiksuotas peršviečiamąja elektronine mikroskopija. Adaptuota pagal Skripka ir kt., 2019.

LiYF₄ nanodalelių schema ir peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos nuotrauka yra pateikta 35 pav. Iš peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos užfiksuoto vaizdo, matome, kad nanodalelės yra rombo formos, homogeniškos, nesuagregavusios. Nanodalelių ilgosios rombo kraštinės ilgis yra $92,8 \pm 4,8$ nm, o trumposios – $63,7 \pm 3,8$ nm.

LiYF₄:Tm³⁺, Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ nanodalelės šerdis yra sudaryta iš LiYF₄ matricos, legiruotos retųjų žemių metalų jonais Tm³⁺ (0,5 %) ir Yb³⁺ (25 %). Pasirinkti retųjų žemių metalai sudaro sensibilizatoriaus – aktyvatoriaus porą, kuri leidžia gauti apkonversijos procesą. Nanodalelės šerdyje esantys Yb³⁺ jonai sugeria ties 980 nm ir perduoda energiją Tm³⁺ jonams. Tm³⁺ jonai turi kelias emisijos juostas ultravioletinėje, regimojoje ir infraraudonojoje spektro dalyje. Nanodalelės šerdis buvo padengta LiYF₄ sluoksniu. Šis sluoksnis nebuvo legiruotas, jo funkcija yra atskirti nanodalelės šerdį nuo antrojo apvalkalo. Antrąjį nanodalelės apvalkalą sudaro LiYF₄ sluoksnis legiruotas Nd³⁺ jonais (1 %). Šis sluoksnis gali būti sužadinamas 793 nm arba 806 nm šviesa ir pasižymi emisija infraraudonojoje srityje. Šiame sluoksnyje apkonversijos procesas nevyksta, vyksta emisija pagal Stokso dėsnį: sluoksnis sužadinamas didesnės energijos spinduliuote, o emituoja mažesnės energijos spinduliuotę. Tam, kad būtų padidintas nanodalelių stabilumas ir biosuderinamumas, jos buvo padengtos fosfolipidų (DOPC/PEG-DOPE) sluoksniu.



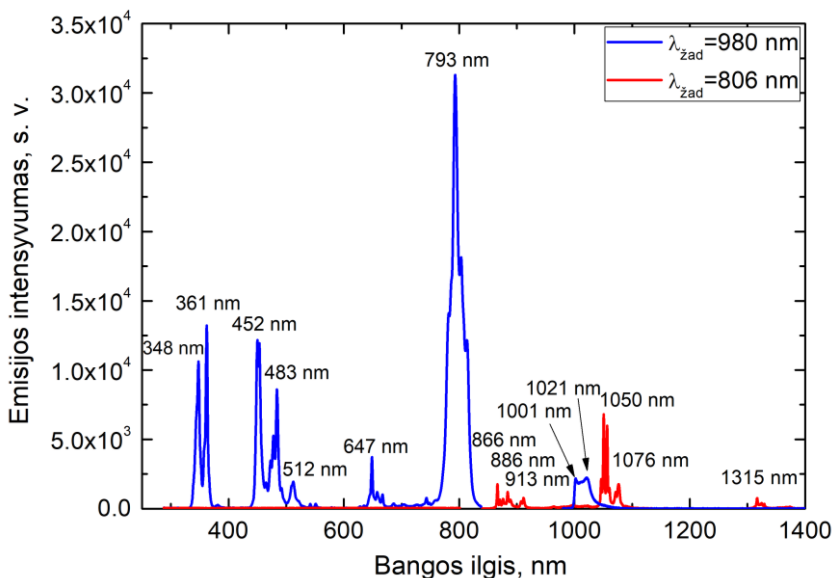
36 pav. A) LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ nanodalelės sandara. B) LiLuF₄ nanodalelių peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos vaizdas. Skalė 50 nm.

LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ nanodalelės sudarytos iš šerdies ir 3 ją dengiančių sluoksnių (36 pav. A). Šių nanodalelių šerdis sudaryta iš LiLuF₄ matricos legiruotos Nd³⁺ jonais. Taigi, šiuo atveju nanodalelės šerdis atlieka diagnostinę funkciją. Pirmasis dangalas LiLuF₄ yra optiškai neaktyvus, naudojamas diagnostinės ir terapinės dalių atskyrimui. Antrasis dangalas sudarytas iš LiYbF₄ matricos legiruotos Er³⁺ jonais. Šis sluoksnis atlieka šviesos apkonversiją ir naudojamas terapinei nanodalelės

funkcijai atlikti. Papildomai dedamas optiškai neaktyvus LiLuF₄ sluoksnis, kuris yra reikalingas, kad būtų kuo mažiau gesinamas už apkonversijos procesą atsakingas sluoksnis. Peršviečiamosios elektroninės mikroskopijos metodu buvo nustatytas šių nanodalelių dydis: ilgoji kraštinė siekė $33,5 \pm 1,7$ nm, o trumpoji kraštinė – $30,8 \pm 1,4$ nm (36 pav. B).

4.2.1. Retųjų žemių metalų nanodalelių spektrinės savybės

37 pav. yra pateiktas LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ nanodalelių emisijos spektras vandenyje. Dalelės buvo žadinamos 980 nm arba 806 nm spinduliuote. Žadinant 980 nm spinduliuote vyksta apkonversijos procesas: sužadunami Yb³⁺ jonai, kurie perduoda energiją Tm³⁺, vėliau vyksta emisija iš Tm³⁺ sužadintų energinių lygmenų. LiYF₄ nanodalelės pasižymi emisija nuo UV iki IR spektrinės srities. Ryškiausios smailės yra: UV srityje ties 348 nm ir 361 nm, mėlynos smailės ties 452 nm ir 483 nm, žalia smailė ties 512 nm, raudona smailė ties 647 nm ir 793 nm smailė artimojoje IR srityje. Taip pat žadinant 980 nm spinduliuote matomos dvi smailės ties 1001 nm ir 1021 nm, atsiradusios dėl emisijos pagal Stokso dėsnį. Žadinant 806 nm spinduliuote apkonversijos procesas nevyksta, tačiau vyksta emisija pagal Stokso dėsnį. 806 nm šviesą sugeria Nd³⁺ ir emituoja infraraudonojoje srityje ties 866 nm, 886 nm, 913 nm, 1050 nm, 1076 nm ir 1315 nm.

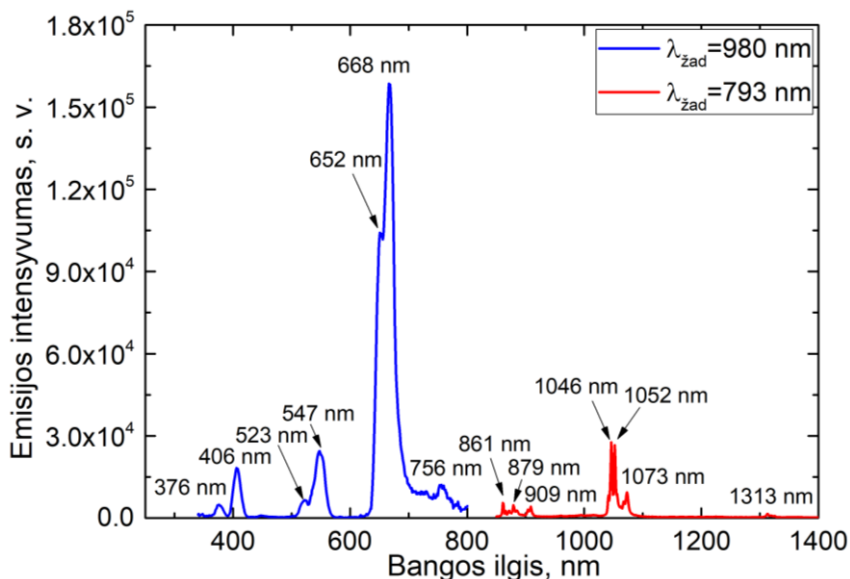


37 pav. LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ nanodalelių (0,8 mg/ml) emisijos spektras distiliuotame vandenyje žadinant 980 nm (mėlyna spalva) ir 806 nm (raudona spalva).

Iš šio emisijos spektro matome, kad LiYF₄ pritaikymas gali būti labai platus. Mus labiausiai domina ta elektromagnetinių bangų sritis, kuri patenka

į audinių optinio skaidrumo langą, kadangi tokia šviesa giliausiai prasiskverbia į audinius. LiYF_4 susikaupimą audiniuose būtų galima stebėti žadinant 980 nm ir registruojant liuminescenciją ties 793 nm smaile, kuri patenka į pirmąjį audinių optinio skaidrumo langą (650-950 nm), arba žadinant 806 nm stebėti antrame audinių optinio skaidrumo lange (1050-1350 nm). Tuo tarpu emisija UV regione galėtų būti panaudota įvairiems, prie nanodalelės prijungtiems, fotosensibilizatoriams sužadinti, kurie gerai sugeria UV srityje. Tokiu būdu būtų užtikrintas selektyvus gydymas, organizmas būtų švitinamas nepavojinga IR spinduliuote, o UV spinduliai būtų išspinduliuojami lokaliai, tik tose ląstelėse, kuriose yra nanodalelės. Kadangi UV spinduliuotė nėra skvarbi, ji nepažeistų sveikų audinių, nes iki jų tiesiog nepraeitų.

Taip pat buvo išmatuoti $\text{LiLuF}_4:\text{Nd}^{3+}@\text{LiLuF}_4@\text{LiYbF}_4:\text{Er}^{3+}@\text{LiLuF}_4$ nanodalelių spektrai distiliuotame vandenyje (38 pav.). Žadinant daleles 793 nm bangos ilgio spinduliuote sužadinami LiLuF_4 nanodalelių šerdyje esantys Nd^{3+} jonai, kurie pasižymi emisija IR spektrinėje srityje. Buvo registruojamos kelios emisijos juostos infraraudonojoje srityje ties 861 nm, 879 nm, 909 nm, 1046 nm, 1052 nm, 1073 nm. Žadinant nanodaleles 980 nm sužadinamas $\text{LiYbF}_4:\text{Er}^{3+}$ sluoksnis, šviesą sugeria Yb ir perduoda Er^{3+} jonams. Vyksta apkonversijos procesas, emituojama šviesa UV srityje ties 376 nm, violetinėje srityje – 406 nm, žalioje ties 523 nm bei 547 nm, raudonoje ties 652 nm bei 668 nm ir 756 nm smailė artimoje IR srityje.

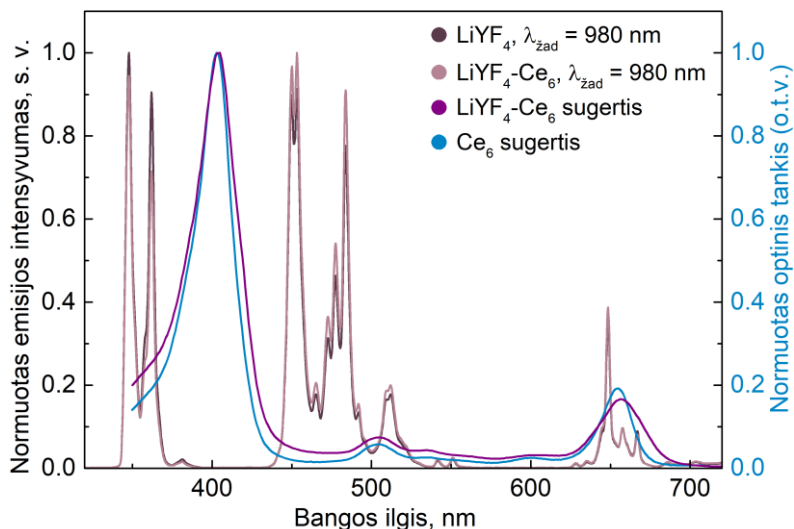


38 pav. $\text{LiLuF}_4:\text{Nd}^{3+}@\text{LiLuF}_4@\text{LiYbF}_4:\text{Er}^{3+}@\text{LiLuF}_4$ nanodalelių (0,1 mg/ml) emisijos spektras distiliuotame vandenyje žadinant 980 nm (mėlyna spalva) ir 793 nm (raudona spalva).

Lyginant LiYF_4 ir LiLuF_4 nanodalelių spektrus galime pastebėti, kad LiLuF_4 nanodalelių emisija yra didesnio intensyvumo, nors matuota mažesnė koncentracija. Emisijos juostos IR srityje iš Nd^{3+} jonų abiejuose nanodalelėse panašios, skiriasi tik intensyvumai. Tuo tarpu apkonversijos emisijos juostos skiriasi: LiYF_4 nanodalelių intensyviausia juosta yra ties 793 nm, o LiLuF_4 – ties 668 nm. 793 nm emisijos juosta tinkamesnė vaizdinimui IR srityje, tačiau nėra tinkama FS sužadinimui. Kita vertus, 668 nm emisijos juosta gali būti naudojama tiek vaizdinimui raudonoje srityje, tiek FS, tokių kaip Ce_6 , sužadinimui. Toliau buvo nagrinėjama, kaip persidengia LiYF_4 bei LiLuF_4 nanodalelių emisijos spektrai su Ce_6 sugerties spektrais.

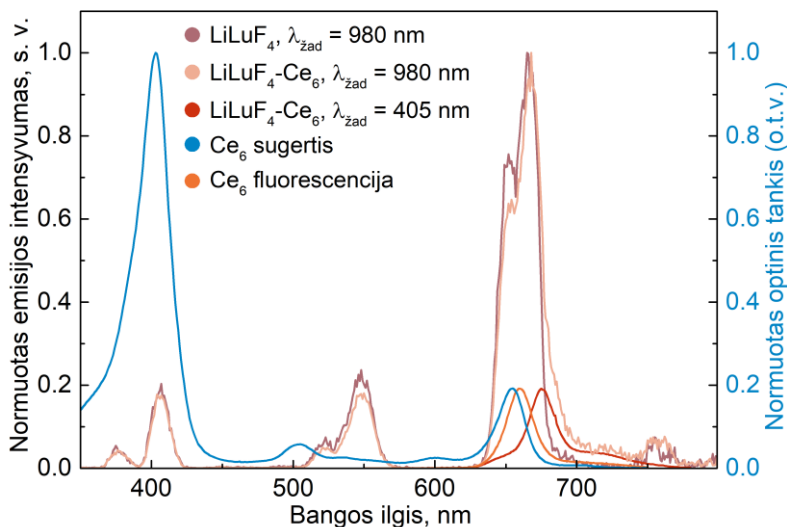
4.2.2. Komplexo sudarymas ir charakterizavimas

39 pav. yra pateikti LiYF_4 nanodalelių bei $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso emisijos spektrai, normuoti ties 793 nm, bei Ce_6 sugerties spektrai, kai Ce_6 yra laisvas tirpale arba komplekse su LiYF_4 . Matome, kad LiYF_4 nanodalelių emisijos ir Ce_6 sugerties spektrai dalinai persidengia. Vadinasi, žadinant LiYF_4 980 nm, jų išspinduliuota UV ir regimoji šviesa gali būti sugerta Ce_6 molekulių. Kadangi $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekse Ce_6 molekulės yra išsidėsčiusios LiYF_4 paviršiuje, net ir neskvarbi UV šviesa sužadina Ce_6 molekules. Tai leidžia daryti prielaidą, kad susintetintas $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas veiks kaip fotosensibilizatorius, kompleksą žadinant 980 nm lazerio spinduliuote.



39 pav. $\text{LiYF}_4\text{:Tm}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ @ LiYF_4 @ $\text{LiYF}_4\text{:Nd}^{3+}$ nanodalelių, chlorino Ce_6 bei jų komplekso spektrinės savybės distiliuotame vandenyje.

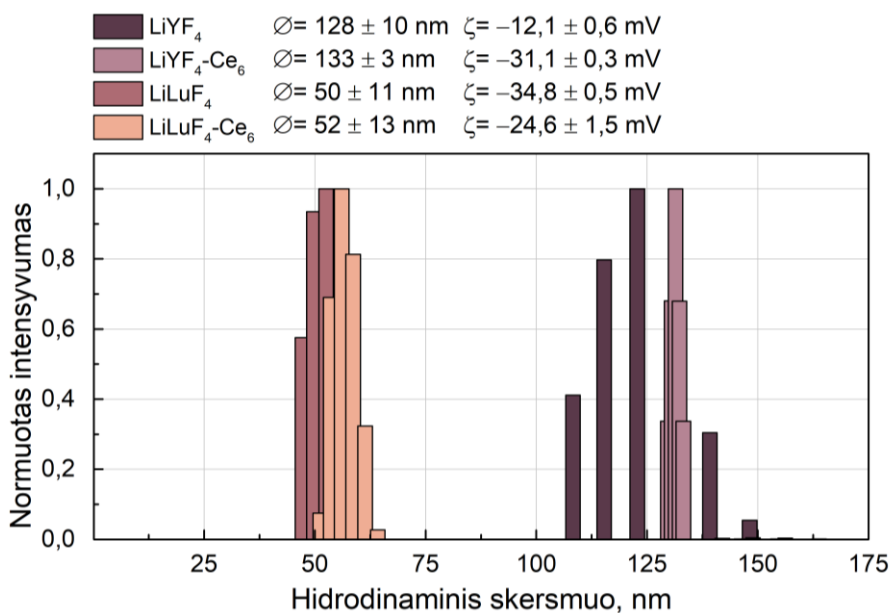
Nagrinėjant 39 pav. pateiktus Ce_6 sugerties spektrus, galime pastebėti, kad Ce_6 sugerties spektras pasikeičia kai prisijungia prie $LiYF_4$ nanodalelių paviršiaus ir suformuoja kompleksą. Ce_6 sugerties spektras turi ryškias chlorinams būdingas juostas. Ryškiausia yra Soret juosta ties 403 nm. Kitos, mažiau intensyvios juostos, yra vadinamos Q juostomis. Q juostos yra numeruojamos nuo ilgabangės šviesos link trumpabangės šviesos. Q(I) juosta yra ties 654 nm, Q(II) juosta – 600 nm, Q(III) juosta – 535 nm, o Q(IV) – 504 nm. Matome, kad $LiYF_4-Ce_6$ komplekse esančio Ce_6 sugerties spektras pasikeitė – Soret juosta pasislinko per 1 nm, o Q(I) juosta – per 3 nm į ilgabangę šviesos diapazoną. Šis pokytis įvyko dėl to, kad pasikeitė Ce_6 molekulių aplinka. Ce_6 spektras matuotas vandeninėje terpėje, taigi, Ce_6 molekulės yra apsuptos vandens molekulių. Kai Ce_6 molekulės inkubuojamos su $LiYF_4$, jos išsidėsto $LiYF_4$ fosfolipidiniame sluoksnyje, vadinasi, jos yra apsuptos fosfolipidų, o ne vandens. Šie spektro pokyčiai patvirtina, kad tikrai įvyko komplekso susidarymas (Valanciunaite ir kt., 2010). Tačiau matome, kad Ce_6 molekulių sugertis reikšmingai nepasikeitė, išliko chlorinams būdinga spektro forma ir sugerties intensyvumas toks pats, kaip ir laisvo Ce_6 . Vadinasi, būdamas $LiYF_4-Ce_6$ komplekso sudėtyje, Ce_6 turėtų atlikti fotosensibilizatoriaus funkcijas.



40 pav. $LiLuF_4:Nd^{3+}@LiLuF_4@LiYbF_4:Er^{3+}@LiLuF_4$ nanodalelių, chlorino Ce_6 bei jų komplekso spektrinės savybės distiliuotame vandenyje.

$LiLuF_4$ nanodalelių emisijos persidengimas su Ce_6 sugerties spektru yra pavaizduotas 40 pav. Matome, kad persidengimas yra geresnis – t. y. daugiau spektrinių juostų persikloja. $LiLuF_4$ emisijos juostos ties 376 nm ir 406 nm persikloja su Ce_6 Soret sugerties juosta, o 652 nm ir 668 nm juostos – su Q(I)

juosta. Be to, lyginant LiLuF₄ nanodalelių su LiLuF₄-Ce₆ komplekso emisijos spektrus, galima pastebėti kad atsiranda išplatėjimas ties 668 nm LiLuF₄ emisijos juosta. Siekiant įvertinti ar juostos išplatėjimas atsiranda dėl Ce₆ fluorescencijos, buvo išmatuota LiLuF₄-Ce₆ komplekso fluorescencija žadinant į Ce₆ su 405 nm šviesa. 40 pav. matome, kad Ce₆, esančio komplekse, fluorescencija sutampa su juostos išplatėjimu, matomu žadinant LiLuF₄-Ce₆ su 980 nm spinduliuote. Taip pat galima pastebėti, kad Ce₆, esančio komplekse, fluorescencijos juosta pasislinko, lyginant su laisvo Ce₆ fluorescencija. Šis poslinkis atsirado dėl Ce₆ molekulių mikroaplinkos pasikeitimo ir patvirtina, kad Ce₆ prisikabino prie LiLuF₄ nanodaleles dengiančio polimero.



41 pav. LiYF₄, LiYF₄-Ce₆, LiLuF₄ bei LiLuF₄-Ce₆ nanodalelių hidrodinaminis skersmuo ir zeta potencialai distiliuotame vandenyje.

Įvairiems biologiniams taikymams labai svarbūs parametrai yra nanodalelių dydis ir stabilumas, todėl papildomai buvo išmatuotas nanodalelių hidrodinaminis skersmuo bei zeta (ζ) potencialas (41 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad LiYF₄ nanodalelių hidrodinaminis skersmuo yra 128 ± 10 nm, o prijungus Ce₆ molekules diametras padidėja iki 133 ± 3 nm. Tuo tarpu LiLuF₄ nanodalelės yra daugiau nei dvigubai mažesnės – jų hidrodinaminis skersmuo yra 50 ± 11 nm, o prijungus Ce₆ molekules padidėja iki 52 ± 13 nm. Mažesnis nanodalelių dydis gali nulemti geresnį patekimą į ląsteles. Optimaliausias nanodalelių dydis patekimui į ląsteles yra 40-50 nm (Jiang ir kt., 2008; Hoshyar ir kt., 2016). Kita vertus, kad nanodalelės nebūtų imuninės sistemos

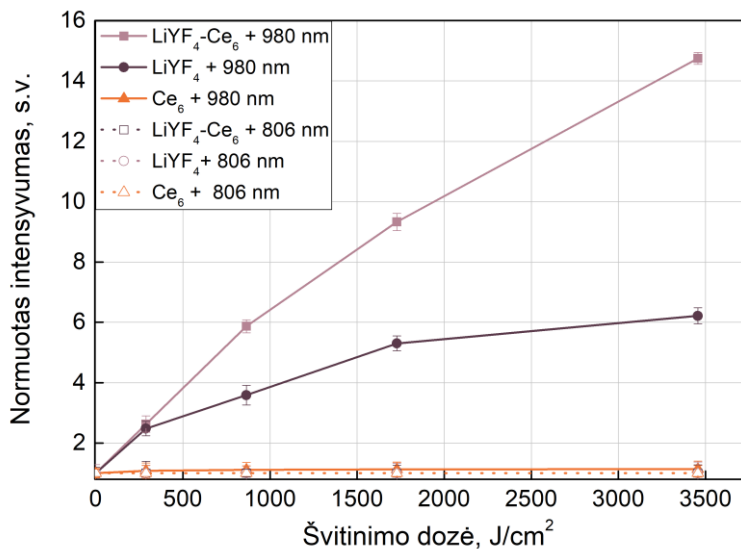
pašalintos iš kraujotakos į kepenis ar blužnį, jų dydis neturėtų viršyti 200 nm (Zhang ir kt., 2021b). Remiantis vien hidrodinaminio dydžio matavimais, tiek LiYF₄, tiek LiLuF₄ nanodalelės yra tinkamos tolimesniems tyrimams biologinėse sistemose, kadangi jų dydis neviršija 200 nm, tačiau mažesnės LiLuF₄ tikėtina geriau kaupsis ląstelėse.

Zeta potencialas yra potencialų skirtumas tarp koloidinės nanodalelės paviršiaus ir ją dengiančių molekulių sluoksnio. Zeta potencialas yra svarbus ir lengvai išmatuojamas koloidinių tirpalų stabilumo rodiklis. Mažas zeta potencialas (artimas 0) rodo, kad koloidinis tirpalas yra nestabilus, tuo tarpu didelis zeta potencialas, nepriklausomai nuo krūvio (teigiamas ar neigiamas) rodo, kad koloidinis tirpalas yra stabilus. Siekiant iširti ar tyrimuose naudojami LiYF₄ bei LiLuF₄ vandeniniai tirpalai yra stabilūs, bei kokią įtaką stabilumui turi Ce₆ prijungimas, buvo atlikti zeta potencialo matavimai. Matavimų rezultatai parodė, kad nanodalelės ir jų kompleksai su Ce₆ turi neigiamą krūvį. Buvo nustatyta, kad Ce₆ prijungimas prie LiYF₄ nanodalelių padidina ne tik jų dydį, bet ir stabilumą: zeta potencialas padidėja nuo $-12 \pm 0,6$ mV iki $-31,1 \pm 0,3$ mV. Stabilumo padidėjimas atsispindi ir hidrodinaminio dydžio pasiskirstyme: 41 pav. matome, kad LiYF₄ nanodalelių dydis yra labiau išsibarstęs nei LiYF₄-Ce₆ komplekso. Priešingai nei LiYF₄, LiLuF₄ nanodalelių stabilumas prijungus Ce₆ sumažėja ir zeta potencialo vertė pasikeičia nuo $-34,8 \pm 0,5$ mV iki $-24,6 \pm 1,5$ mV.

4.2.3. Singuletinio deguonies generavimo tyrimai

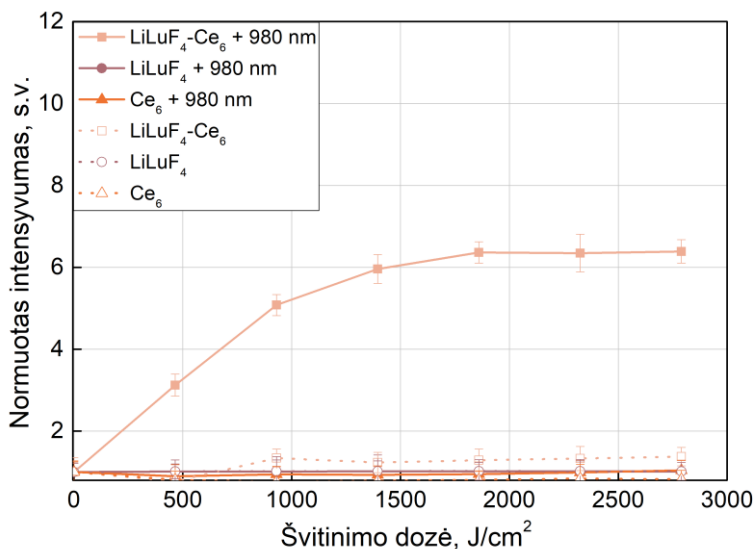
Singuletinio deguonies generavimo nustatymui buvo naudojamas singuletinio deguonies indikatoriumi SOSG. Vandeniniai tirpalai LiYF₄, Ce₆ ir LiYF₄-Ce₆ tirpalai buvo švitinami 980 nm arba 806 nm lazerio spinduliuote. 42 pav. yra pateiktas SOSG fluorescencijos intensyvumo pokytis atspindintis šių tirpalų ¹O₂ generavimo efektyvumą. Ce₆, švitinamas 980 nm lazerio spinduliuote singuletinio deguonies negeneruoja visai. Švitinant LiYF₄ susidarė nedidelis kiekis ¹O₂. Pačios nanodalelės neturėtų pasižymėti savybe generuoti singuletinį deguonį. Matoma ¹O₂ generacija galėjo atsirasti, dėl netiesiogiai žadinamo SOSG švitinimo metu. 980 nm spinduliuotė sužadino LiYF₄, kurios dėl apkonversijos išspinduliavo šviesą regimojoje srityje. Pastaroji galėjo sužadinti SOSG molekules ir inicijuoti fotocheminius pokyčius švitinimo metu. Tačiau negalime atmesti galimybės, kad pačios LiYF₄ nanodalelės švitinamos 980 nm spinduliuote generuoja ¹O₂. LiYF₄-Ce₆ komplekso švitinimo metu susidaro didesnis kiekis ¹O₂, lyginant su bandiniais, kuriuose buvo tik LiYF₄ nanodalelės be Ce₆. Kadangi 980 nm spinduliuotė sužadina tik LiYF₄, galime teigti, kad susidariusiame komplekse

sėkmingai vyksta LiYF_4 išspinduliuotos šviesos sugertis Ce_6 molekulėse. Žadinant tirpalus 806 nm lazeriu, nei viename iš tirpalų $^1\text{O}_2$ nesusidarė. Vadinasi, nei pačios LiYF_4 nanodalelės, nei $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas negeneruoja $^1\text{O}_2$, veikiant 806 nm spinduliuote ir ši spinduliuotė gali būti naudojama diagnostinėms $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ savybėms realizuoti.



42 pav. LiYF_4 nanodalelių, Ce_6 bei $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso singuletinio deguonies generavimo efektyvumas, bandinius švitinat 980 nm arba 806 nm lazeriu. Išmatuota naudojant singuletinio deguonies indikatorį SOSG.

Analogiškas $^1\text{O}_2$ generacijos tyrimas buvo atliktas ir su LiLuF_4 bei $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ nanodalelėmis. Šiuo atveju kontroliniai bandiniai su LiLuF_4 , $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ ir Ce_6 buvo laikomi tamsoje, o tiriamieji – švitinami su 980 nm tol, kol pasiekiamas maksimalus SOSG fluorescencijos intensyvumas. Kaip matome 43 pav. SOSG fluorescencijos intensyvumas augo tik tuose bandiniuose, kuriuose buvo $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksas, kitaip nei LiYF_4 , pačios LiLuF_4 nanodalelės $^1\text{O}_2$ švitinimo metu negeneravo. Bandiniuose su $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu SOSG fluorescencija išaugo daugiau nei 6 kartus, surinkus 1860 J/cm^2 ir švitinant didesnėmis dozėmis fluorescencijos intensyvumas nebeaugo. Tuo tarpu bandiniuose su $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ po panašios švitinimo dozės SOSG fluorescencijos intensyvumas išaugo daugiau nei 9 kartus. Šie duomenys rodytų, kad $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ intensyviau generuoja $^1\text{O}_2$ lyginant su $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$. Tačiau vien $^1\text{O}_2$ generacijos efektyvumas tirtas tirpaluose neparodo, kurios nanodalelės yra tinkamesnės pritaikymui FNT, dėl to yra būtina atlikti tyrimus su ląstelėmis.



43 pav. LiLuF₄ nanodalelių, Ce₆ bei LiLuF₄-Ce₆ komplekso singuletinio deguonies generavimo efektyvumas, bandinius švitinant 980 nm lazeriu arba laikant tamsoje. Išmatuota naudojant singuletinio deguonies indikatorį SOSG.

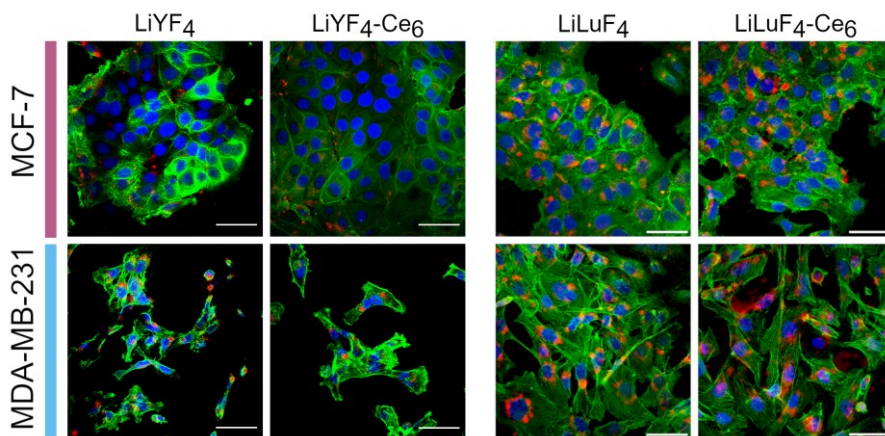
4.2.4. Susikaupimas vėžinėse ląstelėse ir biosuderinamumas

LiYF₄, LiYF₄-Ce₆, LiLuF₄ bei LiLuF₄-Ce₆ susikaupimas krūties vėžinėse ląstelėse po 24 val. inkubacijos yra pateiktas 44 pav. Nanodalelių susikaupimas ląstelėse buvo vertinimas kokybiškai konfokalinės mikroskopijos metodu. Ląstelės buvo inkubuojamos su nanodalelėmis 24 val., tada fiksuojamos ir dažomos fluorescenciniais dažais. Vėliau fiksuoti bandiniai buvo vaizdinami konfokaliniu mikroskopu.

44 pav. matome, kad visos tirtos nanodalelės (raudona spalva) susikaupia ląstelėse ne difuziškai, o išsidėsto vezikulėse netoli ląstelių branduolių (mėlyna spalva), tačiau į pačius branduolius nanodalelės nepatenka. Šių nanodalelių susikaupimas ląstelėse atitinka tipinį retaisiais žemių metalais legiruotų nanodalelių kaupimąsi ląstelėse, aprašytą, kitose publikacijose (Baziulyte-Paulaviciene ir kt., 2017; Voronovic ir kt., 2021; Klimkevicius ir kt., 2022).

Nanodalelių patekimo į ląsteles būdai labai priklauso nuo pačių nanodalelių dydžio, naudojamų dangalų ir formos (Panzarini ir kt., 2018). Šiame darbe, tyrimai, skirti nustatyti tiksliam patekimo mechanizmui, nebuvo atlikti. Tačiau išsamūs LiYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ nanodalelių patekimo mechanizmo tyrimai aprašyti Voronovic ir kt. publikacijoje (Voronovic ir kt., 2021). Buvo nustatyta, kad LiYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ nanodalelės į MCF-7 ir MDA-MB-231 ląsteles patenka endocitozės arba makropinocitozės būdu, o tikslus patekimo

mechanizmas priklauso nuo nanodalelių padengimo ir baltyminio vainiko, kuris susidaro nanodalelei sąveikaujant su ląstelių mitybinės terpės baltymais. Publikacijoje buvo parodyta, kad fosfolipidais padengtos $\text{LiYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ nanodalelės į ląsteles patenka nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu, padengtos citratu – į MCF-7 ląsteles patenka taip pat nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu, tačiau į MDA-MB-231 ląsteles – nuo klitrino priklausomos endocitozės būdu. Tuo tarpu apie silicio oksidu padengtas nanodaleles susiformuoja didžiausias baltyminis vainikas, jų dydis padidėja ir dėl to į ląsteles patenka makropinocitozės būdu (Voronovic ir kt., 2021). Kitame tyrime buvo parodyta, kad $\text{LiYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$, padengtos lipidų dvisluoksniu, į žmogaus plaučių vėžio ląsteles A549 pateko nuo klitrino arba nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu, tačiau dalis nanodalelių pateko ir pasyviosios pernašos būdu (Rojas-Gutierrez ir kt., 2019).



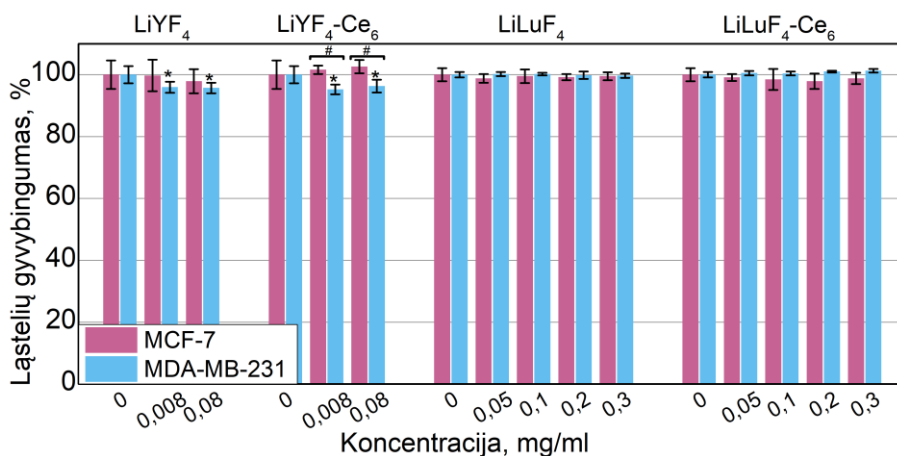
44 pav. LiYF_4 , $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$, LiLuF_4 bei $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ (raudona spalva, $\lambda_{\text{zad}} = 980 \text{ nm}$) susikaupimas krūties vėžinėse ląstelėse MCF-7 bei MDA-MB-231 po 24 val. inkubacijos. Nanodalelių koncentracija 0,1 mg/ml. Ląstelių branduoliai nudažyti su branduolių dažu Hoechst 33258 (mėlyna spalva, $\lambda_{\text{zad}} = 404 \text{ nm}$), citoskeletas su Phalloidin-Alexa488 (žalia spalva, $\lambda_{\text{zad}} = 488 \text{ nm}$). Skalė 50 μm .

Šiame tyrime naudotos LiYF_4 nanodalelės buvo panašaus dydžio kaip ir Voronovic ir kt. publikacijoje bei padengtos fosfolipidais, tad greičiausiai jos į ląsteles pateko nuo kaveolino priklausomos endocitozės būdu. LiLuF_4 nanodalelės buvo padengtos komerciškai įsigytu polimeru, būtent šiuo polimeru padengtų nanodalelių kaupimasis ląstelėse nebuvo tirtas, tačiau pagal nanodalelių dydį, tikėtina, kad jos į ląsteles pateko endocitozės būdu, nors tiksliam patekimo mechanizmui nustatyti reikėtų atlikti daugiau tyrimų.

Vertinant LiYF_4 ir $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ susikaupimą MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelėse, buvo pastebėta, kad $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ emisijos signalas buvo mažesnis nei LiYF_4 , išlaikant tas pačias sąlygas. LiYF_4 nanodalelių emisija buvo

fiksuojiama mėlyname kanale (450/17 nm) ir tik vėliau mėlyna buvo pakeista į raudoną pseudo spalvą, kad būtų aiškesnis atvaizdavimas. Kadangi Ce_6 sugeria toje pačioje srityje, natūralu, kad fiksuojama $LiYF_4$ emisija sumažėjo dėl Ce_6 sugerties. Tokio signalo sumažėjimo nebuvo pastebėta vertinat $LiLuF_4$ bei $LiLuF_4-Ce_6$ susikaupimą ląstelėse, priešingai, pastebėta, kad $LiLuF_4-Ce_6$ signalas yra intensyvesnis, tačiau šių nanodalelių emisija buvo fiksuota raudoname kanale (>620 nm), tad kartu buvo fiksuojama ir Ce_6 fluorescencija.

Taip pat buvo pastebėta, kad $LiYF_4$ ir $LiYF_4-Ce_6$ nanodalelės geriau kaupiasi MDA-MB-231, nei MCF-7 ląstelėse. MCF-7 ląstelės yra linkusios formuoti kolonijas, tuo tarpu MDA-MB-231 linkusios augti grupėmis, tačiau kolonijų nesudaro. Būtent šis skirtumas gali lemti tai, kad tiek $LiYF_4$ ir $LiYF_4-Ce_6$ geriau susikaupė MDA-MB-231 ląstelėse. Iš 44 pav. matome, kad nanodalelės yra linkusios kauptis MCF-7 kolonijų išorinėse ląstelėse, tuo tarpu į patį kolonijos centrą nanodalelių patekimas yra ribotas. Išimtis – mažos MCF-7 ląstelių kolonijos, sudarytos iš 3-6 ląstelių, kuriose kiekviena ląstelė yra kolonijos krašte. Analizuojant $LiLuF_4$ ir $LiLuF_4-Ce_6$ susikaupimą ląstelėse, nebuvo pastebėta jokio skirtumo, priklausomai nuo ląstelių linijos. Tiek MCF-7, tiek MDA-MB-231 $LiLuF_4$ ir $LiLuF_4-Ce_6$ susikaupimas buvo labai panašus. Šie $LiYF_4$ ir $LiLuF_4$ nanodalelių susikaupimo ląstelėse skirtumai galėjo atsirasti dėl skirtingų patekimo į ląsteles mechanizmų.



45 pav. MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po 24 val. poveikio su $LiYF_4$, $LiYF_4-Ce_6$, $LiLuF_4$ bei $LiLuF_4-Ce_6$ nanodalelėmis. Išmatuota naudojant LDH citotoksiškumo tyrimo rinkinį. Paklaidos rodo standartinį nuokrypį. * pažymėta statistiškai patikimi skirtumai lyginant su kontrole, # rodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių ($p < 0,05$).

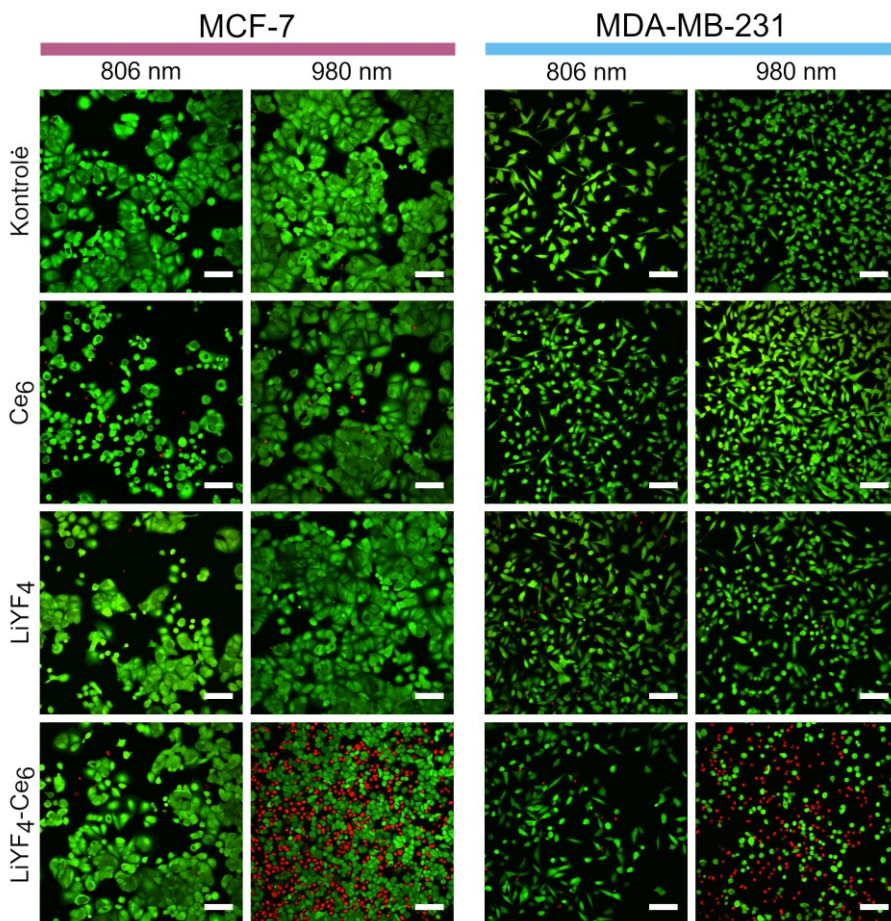
Siekiant nustatyti ar $LiYF_4$, $LiYF_4-Ce_6$, $LiLuF_4$ bei $LiLuF_4-Ce_6$ nanodalelės yra biosuderinamos, buvo ištirtas tamsinis toksiškumas naudojant išsiskyrusio LDH nustatymo rinkinį. Tyrimo metu plokštelė, kurioje ląstelės

inkubuotos su nanodalelėmis, buvo uždenyta aliuminio folija, kad nepatektų šviesa ir nesukeltų fotosensibilizuotų procesų, galinčių sumažinti ląstelių gyvybingumą. 45 pav. matome, kad tiek pačios nanodalelės, tiek jų ir Ce₆ kompleksai nesukelia toksinio poveikio ląstelėms. MCF-7 ląstelių gyvybingumas po poveikio su nanodalelėmis nepakito ir išliko toks pat, kaip ir kontrolinių ląstelių. MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po 24 val. inkubacijos su LiYF₄ ir LiYF₄-Ce₆ nukrito iki 95 %, tačiau nors šis pokytis yra statistikai reikšmingas lyginant su kontrole, tačiau yra nedidelis, todėl galime teigti, kad nanodalelės nesukėlė toksinio poveikio MDA-MB-231 ląstelėms. LiLuF₄ ir LiLuF₄-Ce₆ neturėjo statistiškai reikšmingo poveikio MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumui.

Kol kas dar nėra vieningos išvados apie retaisiais žemių metalais legiruotų nanodalelių toksiškumą, kadangi nėra sukaupta papildomai duomenų. Įvairių mokslinių grupių atlikti tyrimai skiriasi tarpusavyje tirtomis nanodalelėmis, gyvybingumo matavimo metodikomis, naudotomis ląstelių linijomis bei nanodalelių koncentracijomis. Todėl gautus rezultatus yra sunku palyginti tarpusavyje. Vienas svarbesnių veiksnių, lemiančių nanodalelių toksiškumą, yra paviršiaus padengimas. Pavyzdžiui, Wysokinska ir kt. nustatė, kad nepadengtos NaGdF₄@Yb³⁺:Er³⁺ nanodalelės sukelia toksinį poveikį pelės embriono fibroblastams NIH3T3 bei makrofagams RAW264.7, tačiau nanodalelių padengimas PEG toksiškumą sumažina (Wysokińska ir kt., 2016). Mūsų grupės tyrimai parodė, kad 0,04–0,4 mg/ml skirtingų apvalkalų (fosfolipidų, citrato, silicio) LiYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ nanodalelės neturi statistiškai reikšmingo poveikio MCF-7, MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumui (Voronovic ir kt., 2021). Tačiau vėliau tiriant tas pačias LiYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ nanodaleles buvo pastebėta, kad 0,1 mg/ml koncentracijos nepadengtos arba padengtos polimerais nanodalelės po 24 val. inkubacijos sukėlė nedidelį toksinį poveikį MDA-MB-231 ląstelėms (gyvybingumas sumažėjo iki 70–80 %), nors MCF-7 ląstelėms poveikio nebuvo (Klimkevičius ir kt., 2022). Dauguma mokslininkų sutinka, kad retaisiais žemių metalais legiruotos nanodalelės neturi jokio toksinio poveikio trumpuose laiko intervaluose, tačiau iki šiol dar nėra žinoma, kokią įtaką organizmui nanodalelės turėtų ilgalaikėje perspektyvoje (Chen ir kt., 2014; Gnach ir kt., 2015). Wang ir kt. ištyrė NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanodalelių, padengtų polimeriniais dangalais, toksiškumą žmogaus kepenų karcinomos ląstelėse (HepG2) įvairiais metodais ir pastebėjo, kad viršijus 0,05 mg/ml koncentraciją, nanodalelės po 48 val. inkubacijos sukelia toksinį poveikį HepG2 ląstelėms, nors po 24 val. gyvybingumas nebuvo pakitęs (Wang ir kt., 2020). Kitas svarbus aspektas, į kurį reikia atsižvelgti – nanodalelių stabilumas organizme. Wysokinska ir kt. nustatė, kad NaGdF₄:Yb³⁺,Er³⁺ nanodalelės sukelia toksinį poveikį

makrofagams ir eksperimentiškai pademonstravo, kad toksiškumą sukelia Gd jonai, atsiradę yrant nanodalelėms (Wysokińska ir kt., 2019).

4.2.5. $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso fotosensibilizacinis poveikis

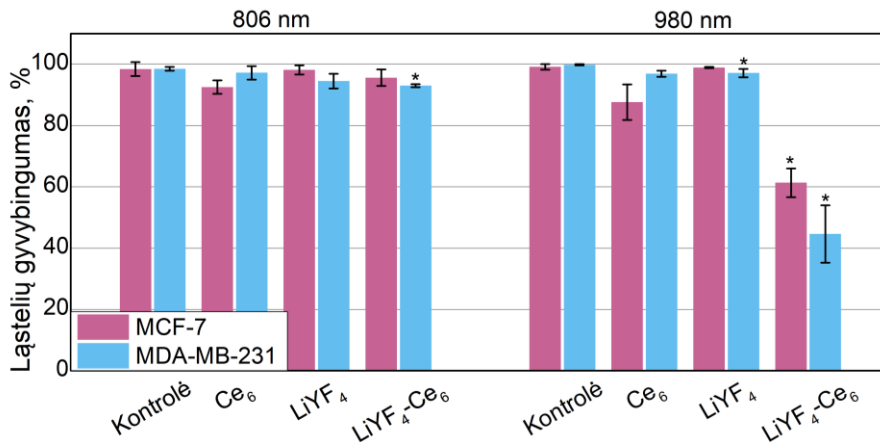


46 pav. MCF-7 bei MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po 24 val. inkubacijos su Ce_6 , LiYF_4 , $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu ir 30 min švitinimo 980 nm arba 806 nm lazerio spinduliuote (galios tankis 500 mW/cm^2). Švitinimo dozė 900 J/cm^2 . Ląstelės nudažytos gyvybingumo dažais. Žalia spalva – kalceinas, dažantis gyvas ląsteles, raudona spalva – etidžio homodimeras-1, dažantis negyvas ląsteles. Skalė $100 \mu\text{m}$.

$\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso tinkamumas FNT buvo patikrintas naudojant MDA-MB-231 ir MCF-7 ląstelių monosluoksnius. Ląstelės buvo švitinamos 980 nm arba 806 nm lazeriu ir dažomos gyvybingumo dažais kalceinu ir etidžio homodimeru-1. Gauti rezultatai yra pateikti 46 pav. Šiame paveiksle matome, kad abiejų ląstelių linijų monosluoksniai (kontrolė) po švitinimo lazerio spinduliuote yra nepažeisti, ląstelės yra gyvybingos. Vadinasi, parinkta

900 J/cm² švitinimo dozė ir lazerio intensyvumas neturi poveikio ląstelių gyvybingumui. Taip pat matome, kad ląstelės, inkubuotos tik su Ce₆ arba LiYF₄, po švitinimo išlieka gyvybingos. Taigi, Ce₆ ir LiYF₄ yra netoksiški ląsteles apšvietus 806 nm arba 980 nm lazerio spinduliuote. Daugiausiai negyvų ląstelių galime matyti bandiniuose, kurie buvo inkubuoti su LiYF₄-Ce₆ kompleksu. Matome, kad švitinimas 980 nm lazeriu ląsteles paveikė toksiškai. Vadinasi, įvyko antrinis Ce₆ molekulių sužadinimas ir ląstelėse buvo generuojamas singuletinis deguonis. Tuo tarpu švitinant 806 nm lazerio spinduliuote, ląstelės inkubuotos LiYF₄-Ce₆ kompleksu išliko gyvybingos. Šie rezultatai rodo, kad tiek LiYF₄, tiek LiYF₄-Ce₆ sėkmingai galėtų būti naudojamos diagnostikai ir biovaizdinimui, nepakenkiant ląstelėms. Taip pat LiYF₄-Ce₆ kompleksas turi potencialo būti pritaikytas kaip fotovaistas.

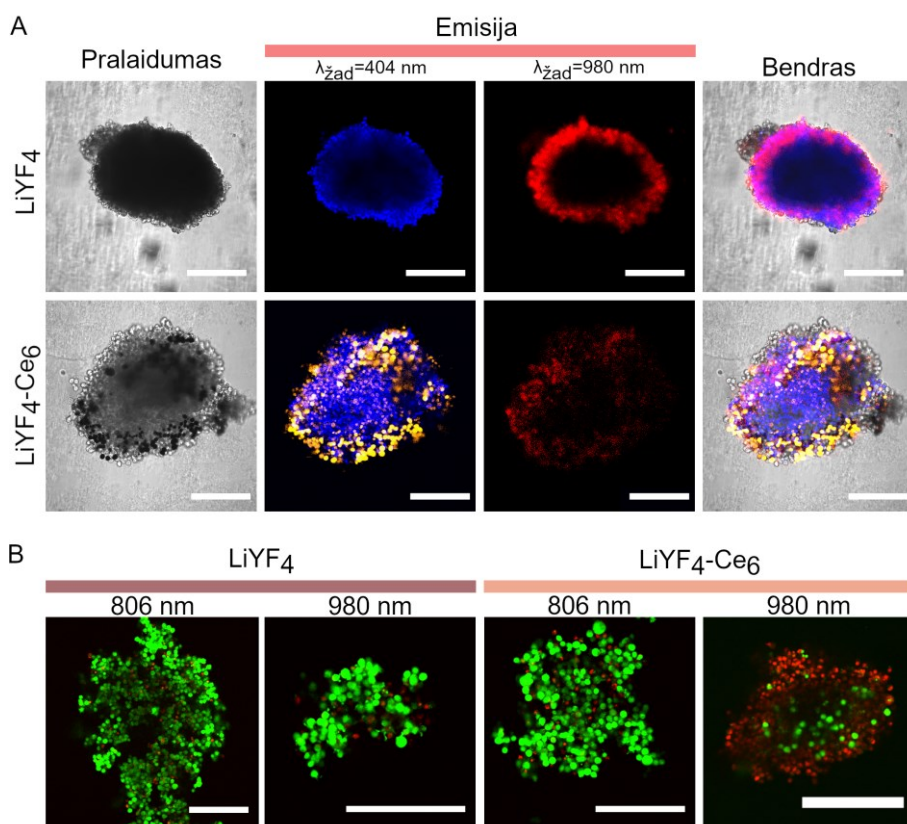
Papildomai buvo kiekybiškai įvertintas LiYF₄ nanodalelių bei LiYF₄-Ce₆ komplekso poveikis ląstelių gyvybingumui po švitinimo 806 nm arba 980 nm lazerio spinduliuote. Ląstelių gyvybingumas buvo apskaičiuotas iš mikroskopijos vaizdų naudojant programą ImageJ. Kaip matome 47 pav., MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas ženkliai sumažėjo, tik tada, kai ląstelės buvo inkubuotos su LiYF₄-Ce₆ kompleksu ir švitintos 980 nm spinduliuote. MCF-7 ląstelių gyvybingumas nukrito iki 61,3 ± 4,7 %, o MDA-MB-231 ląstelių – iki 44,6 ± 9,4 %. Taigi, šiuo atveju MDA-MB-231 ląstelės buvo labiau paveiktos. Kituose bandiniuose buvo nedidelis ląstelių gyvybingumo pasikeitimas arba ląstelių gyvybingumas nepasikeitė visai.



47 pav. Kiekybinis Ce₆, LiYF₄ ir LiYF₄-Ce₆ fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms, po švitinimo 806 nm bei 980 nm šviesa. Paklaidos žymi standartinius nuokrypius. Grafike pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis (*, p < 0,05). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijų nebuvo (p < 0,05).

4.2.6. Tyrimai ląstelių sferoiduose

Siekiant priartinti modelinę sistemą prie *in vivo* tyrimų, LiYF_4 ir $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$, susikaupimas taip pat buvo ištirtas ir MDA-MB-231 ląstelių sferoiduose (48 pav. A). Pirmiausia buvo suformuoti MDA-MB-231 ląstelių 3D sferoidai kabančio lašo metodu, vėliau suformuoti sferoidai buvo inkubuojami 24 val. su LiYF_4 arba $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ bei ląstelių branduolių dažu Hoechst. Po inkubacijos buvo atliekamas vaizdinimas konfokalinio mikroskopu, darant optinius pjūvius skirtingose sferoido plokštumose. Rezultatai parodė, kad tiek LiYF_4 , tiek $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ susikaupė paviršinėse sferoidų ląstelėse, gilesniuose sluoksniuose nanodalelių emisija nebuvo fiksuojama (48 pav. raudona spalva). Tuo tarpu ląstelių branduolių dažas prasiskverbė iki



48 pav. A – MDA-MB-231 ląstelių sferoidai, inkubuoti 24 val. su LiYF_4 nanodalelėmis arba $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu (raudona spalva, $\lambda_{\text{zad}} = 980\text{ nm}$), tiesiogiai Ce_6 buvo žadinamas $\lambda_{\text{zad}} = 404\text{ nm}$, paveiksle – geltona spalva. Ląstelių branduoliai nudažyti su branduolių dažu Hoechst 33258 (mėlyna spalva, $\lambda_{\text{zad}} = 404\text{ nm}$). Skalė 200 μm . B – MDA-MB-231 ląstelių sferoidai inkubuoti 24 val. su LiYF_4 nanodalelėmis arba $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu ir švitinti 806 nm arba 980 nm šviesa ($0,5\text{ W/cm}^2$; 900 J/cm^2) ir nudažyti gyvybingumo dažais. Žalia spalva – kalceinas, dažantis gyvas ląsteles, raudona spalva – etidžio homodimeras-1, dažantis negyvas ląsteles. Skalė 200 μm .

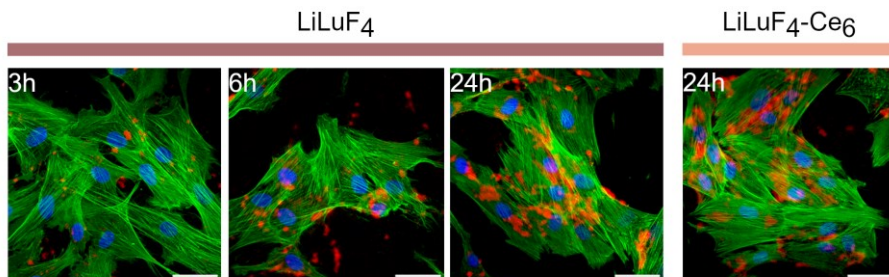
sferoidų centrinės dalies (48 pav. mėlyna spalva). Taigi, matome, kad LiYF_4 ir $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ prasiskverbimas į ląstelių sferoidą yra ribotas. Šie rezultatai sutampa su ankstesniais tyrimais, kurių metų buvo tiriamas kvantinių taškų prasiskverbimas į sferoidą: kvantiniai taškai taip pat susikaupia tik paviršinėse MDA-MB-231 sferoidų ląstelėse (Jarockyte ir kt., 2018). Taip pat iš 48 pav. A matome, kad LiYF_4 , susikaupusių ląstelėse, emisijos intensyvumas yra didesnis nei LiYF_4 ir $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$, žadinant 980 nm lazeriu. Taip yra dėl to, kad dalį spinduliuotės sugeria Ce_6 molekulės. Be to, žadinant 404 nm spinduliuote, fiksuojama intensyvi Ce_6 fluorescencija raudoname kanele, kurios vieta sutampa su stebima LiYF_4 emisija. Sumažėjusi LiYF_4 emisija ir jos persidengimas su Ce_6 reiškia, kad Ce_6 išlieka prisijungęs prie LiYF_4 ir jo gebėjimas fluorescuoti nepakinta.

Papildomai buvo atliktas MDA-MB-231 ląstelių sferoidų, inkubuotų su LiYF_4 ir $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ švitinimas 980 nm arba 806 nm lazeriu ($0,5 \text{ W/cm}^2$) iki 900 J/cm^2 dozės. Po švitinimo sferoidai buvo laikomi inkubatoriuje 24 val., vėliau dažomi gyvybingumo dažais ir vaizdinami konfokalinio mikroskopu. Iš gautų rezultatų (48 pav. B.) matome, kad sferoiduose, kurie buvo inkubuoti su $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ ir švitinti 980 nm spinduliuote, paviršinės ląstelės žuvo (raudona spalva), o giliau esančios ląstelės išliko gyvybingos (žalia spalva). Taigi, žuvo tik tos ląstelės, kuriose buvos susikaupę $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$, o kitos ląstelės nebuvo pažeistos. Švitinant 806 nm spinduliuote poveikių ląstelių gyvybingumui nebuvo. Taip pat sferoidų, kurie buvo inkubuoti su LiYF_4 , ląstelės išliko gyvybingos. Šis tyrimas patvirtina ląstelių monosluoksniuose gautus rezultatus, kad $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ gali būti naudojamas saugiai kaip diagnostinė priemonė apšviečiant 806 nm spinduliuote bei kaip fotovaistas naudojant 980 nm spinduliuotę. Tačiau vis dar išlieka $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ prasiskverbimo į naviką problema. Kadangi $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ susikaupia tik paviršinėse ląstelėse, dabartinis $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ pritaikymas FNT *in vivo* tyrimuose nebūtų efektyvus. Todėl vėlesniuose tyrimuose buvo ieškoma kaip pagerinti nanodalelių pernašą. Pasirinkta taikyti mezenchimines kamienines ląsteles kaip nanodalelių nešiklį.

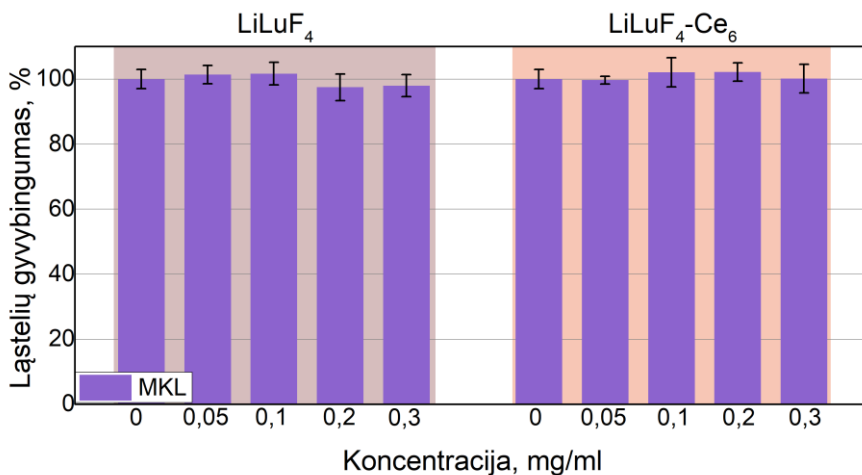
4.2.7. MKL kaip nanodalelių nešikliai

Siekiant pagerinti nanodalelių pernašą, buvo tiriamos odos MKL kaip potencialus nanodalelių nešiklis. Pirmiausia buvo ištirtas LiLuF_4 ir $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ susikaupimas MKL. MKL buvo inkubuojamos su $0,1 \text{ mg/ml}$ LiLuF_4 ir $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$, vėliau ląstelės buvo fiksuojamos, dažomos fluorescenciniais dažais ir vaizdinamos konfokalinio mikroskopu. Po 3 val. inkubacijos su LiLuF_4 jau yra matomas nedidelis nanodalelių susikaupimas MKL (49 pav.

raudona spalva). Ilginant inkubacijos laiką iki 6 val. ar 24 val., buvo stebimas didesnis LiLuF₄ susikaupimas. Nanodalelės kaupėsi ląstelių citoplazmoje, didesnė dalis arti branduolio, tačiau nanodalelių emisijos ir Hoechst fluorescencijos persidingimas nebuvo fiksuojamas, tad galima teigti, kad nanodalelės į branduolius nepateko. Kaupimosi ir lokalizacijos skirtumų tarp LiLuF₄ ir LiLuF₄-Ce₆ nebuvo pastebėta, tad 49 pav. pateikiamas LiLuF₄-Ce₆ susikaupimas tik po 24 val.



49 pav. LiLuF₄ bei LiLuF₄-Ce₆ (0,1 mg/ml) (raudona spalva, $\lambda_{\text{žad}} = 980$ nm) susikaupimas MKL. Ląstelių branduoliai nudažyti su branduolių dažu Hoechst 33258 (mėlyna spalva, $\lambda_{\text{žad}} = 404$ nm), citoskeletas su Phalloidin-Alexa488 (žalia spalva, $\lambda_{\text{žad}} = 488$ nm). Skalė 50 μm .

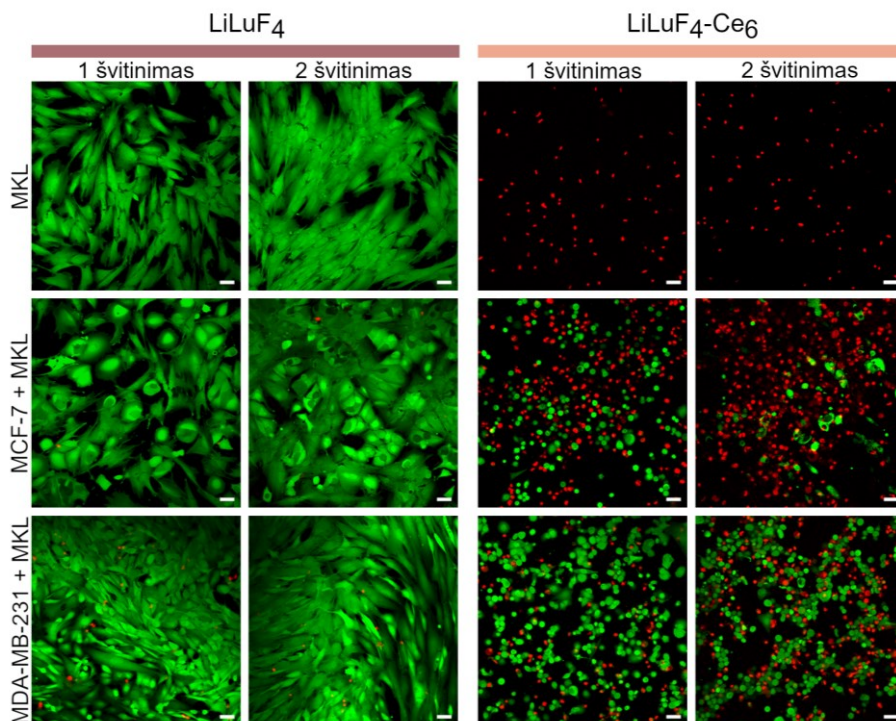


50 pav. MKL gyvybingumas po 24 val. poveikio su LiLuF₄ bei LiLuF₄-Ce₆ nanodalelėmis, priklausomai nuo koncentracijos. Išmatuota naudojant LDH citotoksiškumo tyrimo rinkinį. Paklaidos rodo standartinį nuokrypį. Statistiškai reikšmingų skirtumų nebuvo ($p < 0,05$).

Vienas iš svarbiausių dalykų yra nanodalelių toksiškumo įvertinimas, kadangi norint panaudoti MKL nanodalelių pernašai, nanodalelės turi būti netoksiškos. Siekiant įvertinti LiLuF₄ ir LiLuF₄-Ce₆ biosuderinamumą, MKL buvo inkubuojamos su skirtingų koncentracijų LiLuF₄ arba LiLuF₄-Ce₆ tirpalais (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml) ir atliekamas

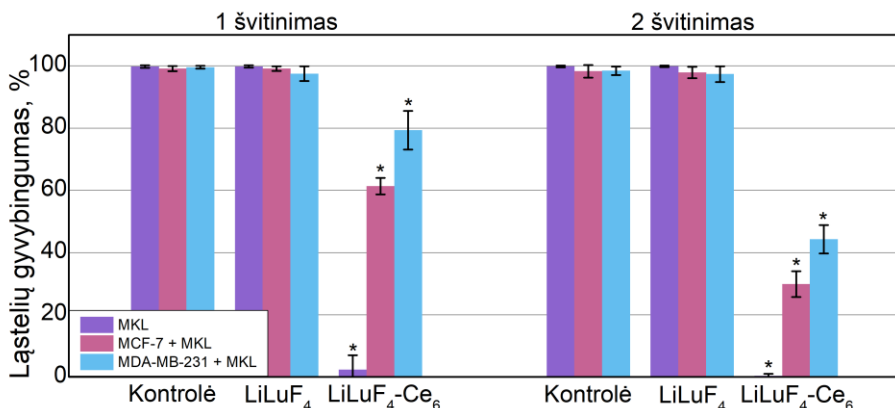
išsiskyrusio LDH nustatymo testas. Gauti duomenys parodė, kad po 24 val. inkubacijos su nanodalelėmis nebuvo gauta statistiškai reikšmingo poveikio MKL gyvybingumui, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis (50 pav.). Taigi, LiLuF₄ ir LiLuF₄-Ce₆ tamsoje nesukelia toksinio poveikio MKL ir gali būti pernešamos naudojant MKL.

Siekiant pademonstruoti terapinį LiLuF₄-Ce₆ potencialą fotosensibilizuotoje navikų terapijoje, pirmiausia buvo atliekami tyrimai su ląstelių monosluoksniais. MKL buvo inkubuojamos su LiLuF₄-Ce₆ ir vėliau surinktos MKL kokultivuojamos su MCF-7 arba MDA-MB-231 ląstelėmis. Kaip kontrolė buvo naudojamos LiLuF₄ nanodalelės, kurios švitinimo metu regeneruoja ¹O₂ (43 pav.). Buvo atliekamas dviejų dozių švitinimas su 980 nm remiantis hipoteze, kad pirmo švitinimo metu, dėl susidariusio ¹O₂ žus MKL, kadangi jose bus susikaupę LiLuF₄-Ce₆, tuomet LiLuF₄-Ce₆ pateks į aplinkinę terpę. Tada LiLuF₄-Ce₆ susikaupę vėžinėse ląstelėse, kurios žūtų po antro švitinimo. Ta pati švitinimo schema buvo naudojama ankstesniuose tyrimuose su kvantinių taškų ir Ce₆ kompleksu (Dapkute ir kt., 2021).



51 pav. Vienų MKL bei MKL kartu su MCF-7 arba MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po inkubacijos su LiLuF₄, LiLuF₄-Ce₆ kompleksu ir vieno arba dviejų švitinimų 980 nm lazerio spinduliuote (galios tankis 900 mW/cm²). Švitinimo dozė 450 J/cm². Tarp švitinimų daryta 24 val. pertrauka. Ląstelės nudažytos gyvybingumo dažais. Žalia spalva – kalceinas, dažantis gyvas ląsteles, raudona spalva – etidžio homodimeras-1, dažantis negyvas ląsteles. Skalė 100 μm.

51 pav. yra pateikta LiLuF₄-Ce₆ komplekso fotosensibilizacinis poveikis ląstelėms, taikant dviejų dozių švitinimo schemą. Po pirmojo švitinimo nustatyta, kad MKL inkubuotos su LiLuF₄-Ce₆ žuvo, tačiau ten kur buvo MKL su LiLuF₄-Ce₆ kokultivuotos su vėžinėmis ląstelėmis, didžioji dalis vėžinių ląstelių išliko gyvybingos. Tačiau, nors vėžinės ląstelės ir išliko gyvybingos, jos prarado būdingą formą, tapo apvalesnės. Vadinas net ir netiesiogiai vėžinės ląstelės buvo paveiktos. Kita vertus, MKL galėjo dalį LiLuF₄-Ce₆ perduoti vėžinėms ląstelėms dar prieš pirmąjį švitinimą. Po antrojo švitinimo gauta, kad bandiniuose, kuriuose buvo kokultivuojamos MKL su LiLuF₄-Ce₆ su vėžinėmis ląstelėmis, didžioji dalis vėžinių ląstelių buvo žuvusios arba galimai prasidėjusi apoptozė, nes vaizdinant buvo matomi ląstelių morfologijos pasikeitimai, būdingi apoptoziniams kūneliams (51 pav.). Tuo tarpu kontroliniuose bandiniuose, kuriuose MKL buvo inkubuotos su LiLuF₄, jokio poveikio ląstelių gyvybingumui nebuvo pastebėta nei po pirmojo švitinimo, nei po antrojo (51 pav.).



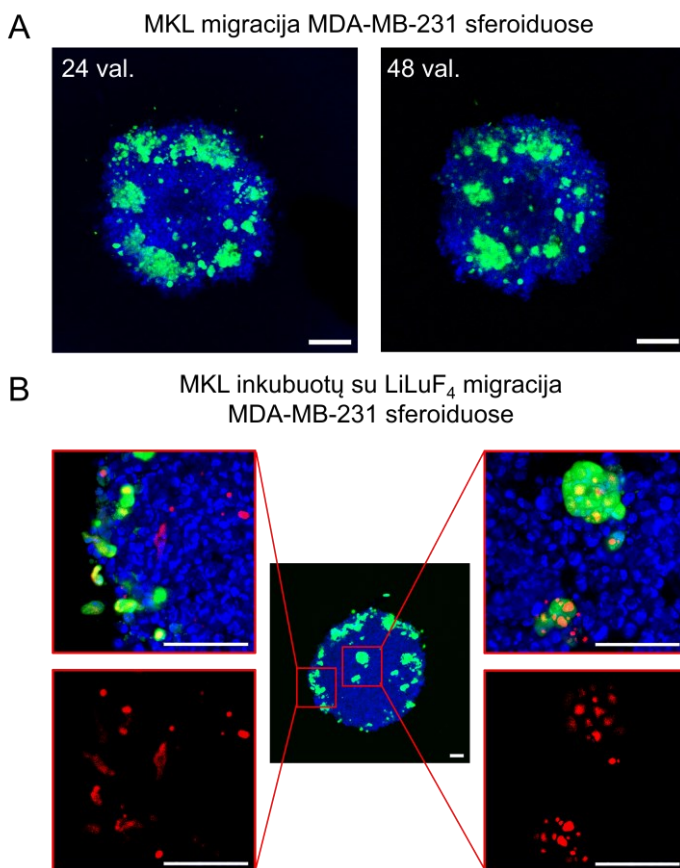
52 pav. Kiekybinis LiLuF₄ ir LiLuF₄-Ce₆ fotodinaminio poveikio įvertinimas MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelėms, po 24 val. inkubacijos su 0,1 mg/ml LiLuF₄ arba LiLuF₄-Ce₆ ir švitinimo 980 nm šviesa. Kontrolė laikyta tamsoje. Paklaidos žymi standartinius nuokrypius. Grafike pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis (*, p ≤ 0,05).

Iš gautų konfokalinės mikroskopijos vaizdų buvo apskaičiuotas ląstelių gyvybingumas, kuris yra pateiktas 52 pav. Gauti rezultatai parodė, kad po pirmo švitinimo visos MKL žuvo, t. y. gyvybingumas nukrito iki 0 %. Tuo tarpu MKL ir MCF-7 ląstelių kokultūrose gyvybingumas sumažėjo iki 61 %, o MKL ir MDA-MB-231 kokultūrose – iki 79 %. Tačiau antrojo švitinimo metu MKL ir vėžinių ląstelių kokultūrų gyvybingumai sumažėjo kur kas daugiau: MKL ir MCF-7 kokultūrose ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki 30 %, o MDA-MB-231 kokultūrose – iki 44 % (52 pav.). Šie rezultatai rodo, kad MCF-7 ląstelės buvo paveiktos labiau nei MDA-MB-231 ląstelės, nors

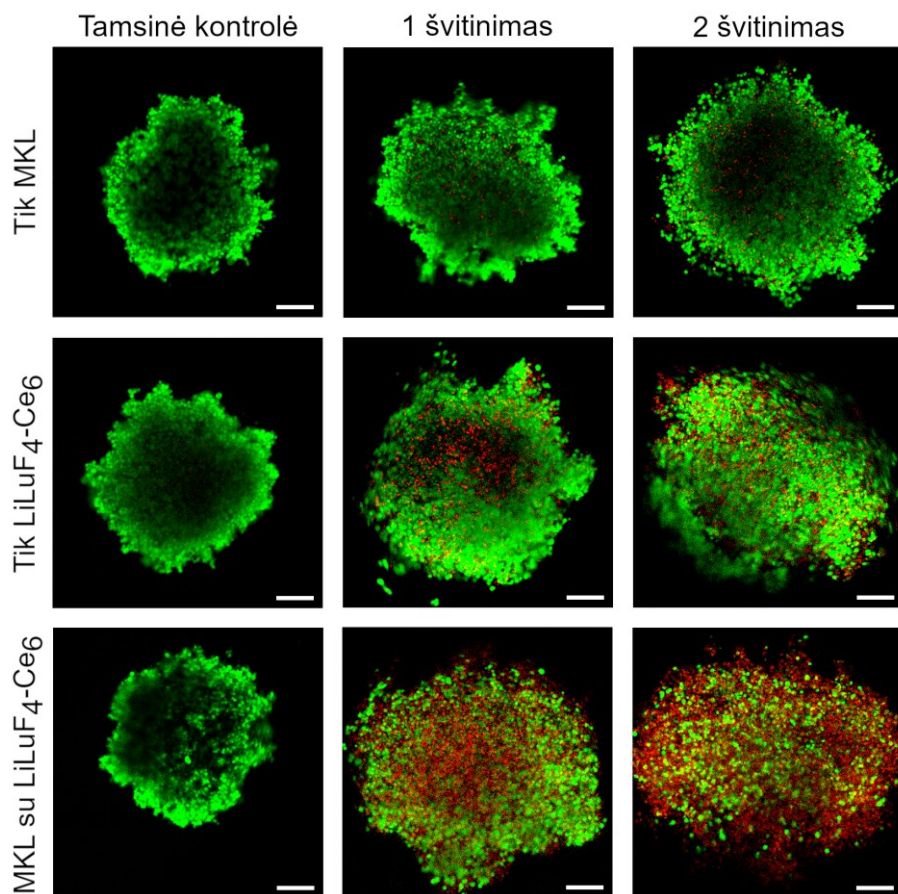
ankstesniuose tyrimuose su $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ labiau paveiktos buvo MDA-MB-231 ląstelės. Atlikus analogišką dviejų dozių švitinimą MKL inkubuojant su LiLuF_4 , reikšmingo ląstelių gyvybingo sumažėjimo nebuvo pastebėta tiek po pirmo, tiek po antro švitinimo (52 pav.).

4.2.8. Nanodalelių pernešimas sferoiduose naudojant MKL

Norint įvertinti MKL gebėjimą migruoti navikuose, buvo pasirinkta trimačių ląstelių kultūrų modelinė sistema, t. y. ląsteliniai sferoidai. Šiame tyrime sferoidai buvo formuojami priverstinio plūduriavimo metodu. Kadangi MCF-7 ląstelės neformuoja sferoidų be pagalbinių medžiagų, tyrimus nuspręsta atlikti MDA-MB-231 ląstelių sferoiduose. Tyrimams buvo pasirinkta naudoti sferoidus suformuotus iš 15000 MDA-MB-231 ląstelių.



53 pav. MKL migracija MDA-MB-231 ląstelių sferoiduose. A – MKL migracija į suformuotą MDA-MB-231 sferoidą po 24 val. ir 48 val. Skalė – 200 μm . B – MKL inkubuotų su 0,1 mg/ml LiLuF_4 migracija į MDA-MB-231 ląstelių sferoidą po 24 val. Mėlyna – ląstelių branduoliai dažyti su Hoechst ($\lambda_{\text{žad}} = 404 \text{ nm}$); žalia – MKL dažytos kalceinu-AM ($\lambda_{\text{žad}} = 488 \text{ nm}$); raudona – LiLuF_4 ($\lambda_{\text{žad}} = 980 \text{ nm}$). Skalė – 100 μm .



54 pav. Fotosensibilizacinis poveikis vėžinių ląstelių sferoidams. Suformuoti MDA-MB-231 sferoidai, inkubuoti su LiLuF₄-Ce₆ (0,1 mg/ml) arba su LiLuF₄-Ce₆ sukaupusiomis MKL santykiu 10:1. Kontroliniai sferoidai inkubuoti tik su MKL (be LiLuF₄-Ce₆). Po 24 val. inkubacijos buvo švitinama su 980 nm lazeriu (0,9 W) iki 450 J/cm² dozės. Po 24 val. dalis sferoidų buvo dažomi su gyvybingumo dažais ir vaizdinami, kiti švitinami pakartotinai ir dažomi bei vaizdinami po dar po 24 val. Žalia – kalceinu-AM dažytos (gyvos) ląstelės ($\lambda_{\text{žad}} = 488$ nm); raudona – propidžio jodidu dažytos (mirusios) ląstelės ($\lambda_{\text{žad}} = 543$ nm). Skalė visose nuotraukose atitinka 200 μm .

Pirmiausia buvo tiriama kaip MKL migruoja MDA-MB-231 ląstelių sferoide (53 pav. A). MKL pažymėjus kalceinu-AM (žalia spalva) ir inkubuojant su iš anksto suformuotu MDA-MB-231 ląstelių sferoidu yra matoma, kad MKL po 24 val. numigravo ir prasiskverbė į sferoido vidų, o pavienės ląstelės pasiekė ir sferoido centrą. Taip pat pastebėta, kad MKL tarpusavyje yra linkusios formuoti mažus sferoidus vėžinių ląstelių viduje. Po 48 val. yra matoma, kad MKL judėjo gilyn į centrą, o pačios MKL yra pasitraukusios nuo sferoido kraštų (53 pav. A). Šie teigiami MKL migracijos rezultatai leido toliau tirti kaip MKL perneša LiLuF₄ nanodaleles į sferoido

vidų. Buvo pasirinkta tolimesniems tyrimams naudoti 24 val. migracijos laiką. Rezultatai pateikti 53 pav. B parodė, kad MKL, prieš tai 24 val. inkubuotos su LiLuF_4 monosluoksnyje, buvo sukaupusios savo viduje nanodaleles ir migravo į MDA-MB-231 ląstelių sferoido vidų (53 pav. B). Vertinant konfokalinės mikroskopijos vaizdus, skirtumų tarp MKL migracijos su ir be LiLuF_4 nanodalelių nebuvo nustatyta. Taip pat pastebėta, kad MKL dalį nanodalelių perdavė vėžinėms ląstelėms, kol migravo į sferoido vidų: 53 pav. B matoma raudona spalva pažymėta LiLuF_4 nanodalelių emisija be žaliu fluorescenciniu dažu pažymėtų MKL. Šie rezultatai patvirtina anksčiau iškeltą hipotezę, kad MKL gali dalį nanodalelių perduoti vėžinėms ląstelėms anksčiau nei žūsta švitinimo metu.

Vėliau buvo tiriama ar tokio MKL prasiskverbimo į MDA-MB-231 sferoidus pakaks FNT efektyvumo pagerinimui. MDA-MB-231 sferoidai buvo inkubuojami su vien tik MKL, vien tik $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ kompleksu arba MKL, nešančiomis $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$. Vėliau buvo atliekamas dviejų dozių švitinimas su 980 nm lazeriu. Sferoidai buvo dažomi gyvybingumo dažais ir vaizdinami konfokaliniu mikroskopu. Gauti rezultatai yra pateikti 54 pav. MDA-MB-231 sferoidus inkubuojant tik su MKL ląstelėmis, reikšmingo poveikio MDA-MB-231 ląstelėms nebuvo pastebėta. MDA-MB-231 ląstelių sferoidus inkubuojant tik su $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ be MKL buvo pastebėta dalies ląstelių žūtis ir sferoido irimas po švitinimų, tačiau gyvybingų ląstelių kiekis išliko kur kas didesnis. Naudojant MKL kaip $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ komplekso nešiklius į MDA-MB-231 ląstelių sferoidus, buvo pastebėtas MDA-MB-231 ląstelių sferoidų gyvybingumo sumažėjimas po abiejų švitinimų su 980 nm spinduliuote. Tiek po pirmo, tiek po antro švitinimo yra matomas sferoido irimas, tačiau antras švitinimas užtikrino didžiosios ląstelių dalies žūtį ir visišką sferoido suirimą į pavienius ląstelių agregatus.

5. APIBENDRINIMAS

Šioje disertacijoje aprašomi tyrimai su Au NK ir retųjų žemių metalų nanodalelių bei Ce₆ kompleksais. Buvo tirti trys skirtingais baltymais padengti Au NK: JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK. Taip pat ištirtos skirtingos retųjų žemių metalų daugiasluoksnės nanodalelės LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ ir LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ bei jų kompleksai – LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆. Pirmiausiai visos nanodalelės buvo charakterizuojamos, išmatuojami nanodalelių dydžiai, gebėjimas generuoti aktyvias deguonies formas. Vėliau buvo atliekami tyrimai su ląstelių monosluoksniais, vertinamas nanodalelių susikaupimas ląstelėse, biosuderinamumas, fotosensibilizacinis poveikis. Papildomai buvo daromi tyrimai su ląstelių sferoidais, siekiant ištirti nanodalelių veikimą sudėtingesnėje modelinėje sistemoje. Taip pat buvo tiriamas nanodalelių pernešimas naudojant MKL. Vykdytų tyrimų rezultatai parodė, kad tirtos nanodalelės turi potencialą būti pritaikytos vėžio teranostikai, tačiau kiekviena sistema turi savo privalumų ir trūkumų, kuriuos reikia aptarti šiek tiek plačiau.

Teranostines nanodaleles panaudoti fluorescencinei diagnostikai ir FNT galima dviem būdais: pati nanodalelė turi elgtis kaip fotosensibilizatorius arba nanodalelė turi būti sujungta su FS ir žadinimo metu jam perduoti energiją (Tavakkoli Yarakı ir kt., 2022). Šiems tyrimams Au NK buvo pasirinkti kaip realiausi kandidatai tapti naujos kartos FS. Kadangi porfirinų tipo FS pagrinde generuoja ¹O₂ (apie 95 % visų ROS) ir tik nedidele dalimi kitas aktyvias deguonies formas, paprastai tyrimuose su nanodalelėmis ieškoma švitinimo metu susidariusio būtent ¹O₂. Tačiau nanodalelių, įskaitant ir Au NK, ROS generacijos mechanizmai yra visai kiti, nei įprastų porfirinų tipo FS, todėl svarbu tirti ir kitų ROS susidarymą. Šiame darbe pirmą kartą buvo parodyta, kad Au NK gali generuoti ir peroksidus bei peroksinitritus, ne tik ¹O₂ (27 pav.) (Poderys ir kt., 2020). Lyginant su gerai žinomu FS Ce₆, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK generuoja bent du kartus daugiau šių ROS nei Ce₆ – ROS generavimo santykiai buvo atitinkamai 2,7 ir 2,3 (plačiau Jarockyte ir kt., 2022a). Nors Ce₆ švitinimo metu generuoja ¹O₂ greičiau ir efektyviau (Au NK generuoja, bet lėčiau – reikia didesnės švitinimo dozės) (28 pav.), tačiau atsižvelgus į suminį visų ROS susidarymą, galima teigti, kad Au NK prilygsta porfirinų tipo FS ir turi potencialo ateityje juos pakeisti.

LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆ kompleksai taip pat generuoja ¹O₂, nors šiuo atveju ROS generacijos mechanizmas kur kas sudėtingesnis. AKND yra žadinamos 980 nm spinduliuote, vyksta apkonversijos procesas, tada AKND išspinduliuoja regimąją šviesą, kurią sugeria Ce₆, kuris generuoja ¹O₂ švitinimo metu. Kol kas nėra įrodyta, kad vyksta Fiorsterio rezonanso

energijos pernaša tarp AKND ir Ce_6 , kaip, pavyzdžiui, KT ir Ce_6 komplekso atveju (Valanciunaite ir kt., 2010), todėl manoma, kad vyksta šviesos išspinduliavimas ir sugėrimas. Kadangi šiuo atveju vyksta keletas procesų ir kiekvieno proceso metu vyksta energijos nuostoliai, be to 980 nm spinduliuotė yra mažesnės energijos lyginant su regimąją šviesa, reikia didelių švitinimo dozių. Kita vertus, tinkamai parinkus dozę, 980 nm spinduliuotė nedaro jokio poveikio. Tačiau esant per didelei švitinimo dozei, gali atsirasti ir terminiai pažeidimai, kadangi 980 nm spinduliuotė sugeria vanduo, tad į tai būtina atsižvelgti.

Kalbant apie biosuderinamumą, tiek Au NK, tiek retųjų žemių metalų nanodalelės yra biosuderinamos ir nesukelia tamsinio toksiškumo (30 pav., 45 pav. ir 50 pav.). Tačiau vienas iš Au NK trūkumų yra tai, kad net ir atliekant fluorescencinę diagnostiką, Au NK yra sužadinami ir yra inicijuojama ROS generacija. Šį trūkumą galima apeiti renkantis alternatyvius vaizdinimo metodus. Au NK galima panaudoti rentgeno ar kompiuterinės tomografijos vaizdinimo metu (Kubiliute ir kt., 2011; Zhang ir kt., 2012; Cole ir kt., 2015), taip pat Au NK pasižymi trečios harmonikos generacija, tad gali būti vaizdinami netiesinės mikroskopijos metodu (Jarockyte ir kt., 2022a). Tokiu būdu būtų galima turėti teranostinę sistemą ir išvengti ROS generacijos nepageidaujamo metu. Naudojant $LiYF_4-Ce_6$ ir $LiLuF_4-Ce_6$ kompleksus, šios problemos nėra, kadangi dalelės tikslingai sukurtos taip, kad diagnostikai būtų naudojamas vienas bangos ilgis (793 nm arba 806 nm), o terapijai kitas – 980 nm. Šiame darbe tirtos atskirtosios diagnostikos ir terapijos nanomedžiagos yra pirmosios paminėtos literatūroje (Scripka ir kt., 2019). Paprastai tiek diagnostika, tiek terapija vyksta nanodaleles žadinant vienu bangos ilgiu (kaip ir Au NK atveju), arba naudojami skirtingi vaizdinimo metodai siekiant išvengti nepageidaujamo fotosensibilizacinio poveikio. Šiame darbe daugiau akcentuojamas $LiYF_4-Ce_6$ ir $LiLuF_4-Ce_6$ kompleksų panaudojimas FNT, tačiau dėl techninių galimybių trūkumo nebuvo parodytas galimas panaudojimas diagnostikai žadinant 793 nm arba 806 nm spinduliuote. Šiuos tyrimus tikimasi atlikti artimiausiu metu.

Visos šiame darbe aprašytos nanomedžiagos turėjo fotosensibilizacinį poveikį vėžinėms ląstelėms. JSA-Au NK fototoksiškumas ląstelėse buvo tirtas naudojant vieną švitinimo dozę, tuo tarpu Rh^+ -Au NK ir Rh^- -Au NK tyrimuose buvo naudotos skirtingos dozės. Tyrimai su plazmos baltymais stabilizuotais Au NK parodė, kad fototoksinis poveikis priklauso nuo švitinimo dozės (32 pav.). Buvo pastebėta, kad taikant mažesnę švitinimo dozę ląstelių morfologija pasikeičia į apoptuojančioms ląstelėms būdingą morfologiją, o taikant didesnę dozę – atsiranda morfologiniai pokyčiai būdingi ląstelių nekrozei. Galima daryti prielaidą, kad taikant mažesnę

švitinimo dozę ląstelės dėl atsiradusių pažeidimų inicijuoja apoptozės procesą, o taikant didesnę dozę ląstelės nespėja prisitaikyti prie pažeidimų ir vyksta nekrozė. Tačiau papildomi tyrimai, kuriais būtų nustatytas tikslus ląstelių žūties mechanizmas, nebuvo atlikti. Taip pat, tiek tyrimuose su JSA-Au NK, ties su Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK buvo pastebėta, kad MCF-7 ląstelės yra paveikiamos labiau nei MDA-MB-231 ląstelės.

Tiriant LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆ kompleksų fototoksiškumą, buvo naudojamos kur kas didesnės švitinimo dozės (900 J/cm² ir 450 J/cm² palyginus su 20-60 J/cm², naudotų Au NK). Lyginant šiuos kompleksus tarpusavyje, LiYF₄-Ce₆ fotodinaminis poveikis buvo ženkliai mažesnis. LiYF₄ nanodalelėse už apkonversijos procesą atsakinga yra nanodalelės šerdis, o tai gali būti papildomas trukdis efektyviam Ce₆ sužadimui. Dėl to kuriant LiLuF₄ nanodaleles buvo racionaliai pasirinkta apkonvertuojanti sluoksnį sintetinti nanodalelės išorėje, siekiant turėti kuo efektyvesnę sistemą. Tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad tiriant LiYF₄-Ce₆ komplekso fototoksiškumą ląstelėse, lazerio šviesa į bandinius nukreipta buvo naudojant šviesolaidį, dėl to dalis energijos buvo prarandama ir galutinis lazerio galios tankis siekė 500 mW/cm². Tuo tarpu tiriant LiLuF₄-Ce₆ kompleksą, lazerio šviesa buvo nukreipiama veidrodžiais, dėl to galutinis lazerio galios tankis siekė 900 mW/cm². Kadangi apkonversija yra netiesinis procesas, žadinančios lazerio spinduliuotės galios tankis ženkliai padidina apkonversijos efektyvumą, dėl to padidėja ir Ce₆ molekulių sužadinimas, ROS generacija ir fotodinaminis poveikis ląstelėms.

Nors naudojant AKND-Ce₆ kompleksus reikia didesnių švitinimo dozių, nei naudojant Au NK, AKND-Ce₆ kompleksai gali būti naudojami gilesniuose sluoksniuose esančių navikų fotosensibilizuotai terapijai. Šiame tyrime Au NK sužadimui naudojama mėlyna šviesa yra neskvarbi audiniuose, tačiau Au NK turi platų FL žadinimo spektrą ir gali būti žadinami ilgesnių bangos ilgių spinduliuote. Kita vertus, 980 nm spinduliuotė vis tiek bus skvarbesnė nei regimoji šviesa, reikalinga Au NK sužadimui. Vadinasi, Au NK yra labiau tinkami paviršinių navikų fotosensibilizuotai terapijai, o AKND-Ce₆ gali būti naudojami universaliau.

Papildomai retųjų žemių metalų nanodalelės buvo tirtos ląstelių sferoiduose, siekiant iširti fotosensibilizacinį komplekso poveikį sudėtingesnėje sistemoje. LiYF₄ nanodalelių susikaupimas ir pasiskirstymas MDA-MB-231 ląstelių sferoiduose yra panašus į karboksi- grupėmis padengtų kvantinių taškų (Jarockyte ir kt., 2018). LiYF₄ ir LiYF₄-Ce₆, kaip ir kvantiniai taškai, išsidėsto ląstelių sferoido paviršiuje ir į centrinę dalį nepraeina. Dėl paviršinio susikaupimo, FNT metu pirmiausia yra paveikiamos išorinės ląstelės, o ląstelės esančios centrinėje sferoido dalyje yra apsaugotos

nuo fototoksinio poveikio (48 pav.). Vadinasi, vėžinės ląstelės navike taip pat būtų paveiktos ne visos, o tik paviršinės. Siekiant pagerinti nanodalelių patekimą į sferoidą, MKL buvo tiriamos kaip nanodalelių nešiklis. Eksperimentų metu buvo pademonstruota, kad iš odos išskirtos MKL gali prasiskverbti į MDA-MB-231 sferoido vidų ir pernešti LiLuF₄ nanodaleles (53 pav.). Taip pat buvo parodyta, kad MKL panaudojimas LiLuF₄-Ce₆ komplekso pernešimui padidina fotoksinį poveikį MDA-MB-231 ląstelių sferoidams (54 pav.). Taigi, MKL panaudojimas nanodalelių pernašai gali padidinti priešvėžinį poveikį navikams.

Siekiant praplėsti tiek Au NK, tiek AKND panaudojimą, galima šias sistemas modifikuoti ir naudoti kaip kontrastines medžiagas šiuo metu taikomuose klinikoje diagnostikos metoduose. Pavyzdžiui, prie JSA-Au NK galima prijungti radioaktyvų technecį ir gautą konjugatą panaudoti kaip kontrastinį žymenį pavienių fotonų emisijos kompiuterinėje tomografijoje (Jarockyte ir kt., 2022b). Šiame darbe aprašytos retųjų žemių metalų nanodaleles savo sudėtyje jau turi Nd³⁺ jonų, kurie leistų minėtas nanodaleles panaudoti kaip MRT kontrastinius žymenis (Zhao ir kt., 2021). Ankstesniuose tyrimuose parodėme, kad NaGdF₄ matricos nanodalelės duoda MRT kontrastą (Baziulyte-Paulaviciene ir kt., 2017), šiuo metu atliekami ir tolimesni tyrimai su retųjų žemių nanodalelėmis, turinčiomis Nd³⁺ arba Gd³⁺ jonų. Pritaikius diagnostikoje tokias nanodaleles būtų galima gauti multimodalinį vaizdinimą bei praplėsti šiuo metu klinikoje naudojamų diagnostikos metodų galimybes.

Šiame darbe tirti Au NK yra perspektyvūs naujos kartos FS, tačiau turi trūkumą – jų žadinimui reikalinga regimoji spinduliuotė, kuri yra mažiau skvarbi audiniuose. Tuo tarpu retųjų žemių metalų nanodalelės optiškai aktyvios audinių skaidrumo lange, tačiau dėl energijos nuostolių fotosensibilizacinis poveikis yra mažiau efektyvus. Siekiant pagerinti abi terasnostines sistemas, ateityje galima jas apjungti. Ankstesni tyrimai parodė, kad retųjų žemių metalų nanodalelės biologinėse terpėse pasidengia baltymų vainiku (Voronovic ir kt., 2021). Baltymų vainiko susidarymas taip pat padeda stabilizuoti nanodaleles (Voronovic ir kt., 2021; Klimkevicius ir kt., 2022). Taigi teoriškai naudojant baltymais stabilizuotus Au NK būtų galima stabilizuoti retųjų žemių metalų nanodaleles ir kartu Au NK panaudoti kaip fotosensibilizatorius. Taigi, šioje disertacijoje aprašyti tyrimai galėtų būti pagrindas tolimesniam teranostinės sistemos kūrimui.

6. IŠVADOS

1. JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK veikiant regimajai šviesai generuoja aktyvias deguonies formas. Tuo tarpu LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ ir LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ nanodalelių ir fotosensibilizatoriaus Ce₆ suformuoti kompleksai generuoja ¹O₂ švitinami audinių skaidrumo lange 980 nm spinduliuote.
2. JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK bei LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆ kompleksai kaupiasi MCF-7 ir MDA-MB-231 vėžinėse ląstelėse ir nedaro poveikio šių ląstelių gyvybingumui tamsoje.
3. JSA-Au NK, Rh⁺-Au NK ir Rh⁻-Au NK generuoja aktyvias deguonies formas ir sukelia fotosensibilizacinį poveikį MCF-7 bei MDA-MB-231 krūties vėžinėse ląstelėse. Šis poveikis yra nevienodas skirtingo piktybiškumo ląstelėms: MCF-7 ląstelės yra paveikiamos labiau nei MDA-MB-231 ląstelės.
4. LiYF₄ ir LiYF₄-Ce₆ prasiskverbimas į MDA-MB-231 sferoidus yra ribotas – nanodalelės susikaupia tik paviršiniuose sferoido ląstelių sluoksniuose.
5. LiYF₄-Ce₆ ir LiLuF₄-Ce₆ kompleksai sužadinti 980 nm spinduliuote, patenkančia į audinių optinio skaidrumo langą, inicijuoja viduląstelinę singuletinio deguonies generaciją bei sukelia vėžinių ląstelių žūtį, ląstelių monoslukksniuose ir sferoiduose.
6. Odos MKL ląstelės perneša LiLuF₄-Ce₆ kompleksus į MDA-MB-231 ląstelių sferoidus bei pagerina komplekso prasiskverbimą ir fotosensibilizacinį poveikį.

7. SUMMARY

Abbreviations

$^1\text{O}_2$ – singlet oxygen;
Au NCs – gold nanoclusters;
BSA – bovine serum albumin;
BSA-Au NCs – bovine serum albumin stabilized gold nanoclusters;
 Ce_6 – chlorin e_6 ;
DHR123 – Dihydrorhodamine 123;
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium;
FBS – fetal bovine serum;
HSA – human serum albumin;
MSCs – mesenchymal stem cells;
NIR – near infrared light;
NP – nanoparticle;
P/S – penicillin and streptomycin solution;
PDT – photodynamic tumour therapy;
PL – photoluminescence;
PS – photosensitizer/photosensitizers;
RENP – rare earth metal-doped nanoparticle;
Rh – rhesus;
 Rh^+ -Au NCs – Rh-positive gold nanoclusters;
 Rh^- -Au NCs – Rh-negative gold nanoclusters;
ROS – reactive oxygen species;
SOSG – Singlet Oxygen Sensor Green;
UCNP – upconverting nanoparticle;
UV – ultraviolet light.

1. Introduction

Rapid development of nanotechnology in the past decades has also offered innovative solutions in medicine. Nanoparticles are being developed and studied as diagnostic markers or as drug carriers which would improve drug delivery, overcome biological barriers, and enable personalized treatment for each patient (Mitchell et al., 2021; Pallares et al., 2022). Some medicines developed using nanotechnology are already being used in the clinic. Lipid and polymer-based nanoparticles are used to increase efficiency of drug delivery to targeted cells (Mitchell et al., 2021). Inorganic nanoparticles are under research as well, some have already been approved as drugs for the clinic (Mitchell et al., 2021), others currently are actively investigated (Alphandéry, 2020).

There has been a lot of efforts devoted for material research, which could be used for both cancer diagnosis and treatment. The field of such research is known as cancer theranostics. Nanomaterial science is used in theranostics to construct a multimodal platform, which would allow to reach several desired effects. These multimodal platforms applied to cancer diseases would eliminate multi-step procedures, reduce delays in treatment and improve patient care and early diagnosis.

One of the main directions of cancer theranostics is the combination of optical biopsy methods and photodynamic tumour therapy (PDT). Porphyrin-type photosensitizers (PS), such as hematoporphyrin or chlorin e_6 (Ce_6), can be considered theranostic materials because they can simultaneously be used as markers for fluorescent diagnostics and PDT. However, PS have several disadvantages such as nonspecific accumulation in healthy tissues, low water solubility, low photostability, as well as cytotoxicity in the dark. Recently, a PS has been developed with properties that avoid most of these drawbacks, but all attempts to improve the specificity of PS accumulation have not been successful (Sarbadhikary et al., 2021). After intravenous injection, PS tend to accumulate not only in the tumour but also in healthy tissues (Castano et al., 2005). When PS accumulate in the skin, the patient becomes sensitive to light. With the development of nanotechnologies, a search for a new generation of PS has begun. The application of nanomaterials to cancer theranostics could bring a breakthrough in oncology. Nanoparticles (NPs) can be used as theranostic platforms for fluorescent cancer diagnostics and PDT in two ways: the NPs themselves can perform two functions, or the NPs could be combined with PS.

Several attempts have been made to develop NPs that perform the PS function themselves. Currently, the most promising and the only ones that can

compare with traditional PS in their photosensitizing properties are gold nanoclusters (Au NCs) (Tavakkoli Yarakı et al., 2022). During Au NCs synthesis, various ligands can be used for Au NCs stabilization, although proteins are the most common choice (Zhang et al., 2021a). The use of proteins allows to create biocompatible Au NCs, and the synthesis itself is considered a green synthesis, since no aggressive chemical reagents are used. Ultra-small, biocompatible, photoluminescent and photosensitizing Au NCs are currently one of the most promising theranostic nanomaterials (Cifuentes-Rius et al., 2021).

The discovery of upconversion nanoparticles (UCNPs) can be considered a major breakthrough in the field of nanotheranostics. Although the phenomenon of upconversion has been known for a long time, only recently, with the development of biocompatible UCNPs, it is possible to use it for biomedical purposes (Chen et al., 2014). UCNPs can be excited with near-infrared light (NIR), resulting in emission in the visible part of the spectrum, which could be used for PS excitation. In this work UCNPs, namely rare earth metal-doped nanoparticles (RENPs), will be used as antennas for PS excitation. 980 nm which is used for RENPs fall into the optical tissue transparency window (650-1300 nm), where there is less absorption of melanin, hemoglobin or water (Qiu et al., 2018), thus such excitation allows to reach deeper tissues. For example, it was demonstrated, that 980 nm excitation *in vivo* can penetrate more than 3 cm (Chen et al., 2012). Being non-toxic, having a large anti-Stokes shift and broad emission in the red and infrared regions, these RENPs can be applied in deep tumour diagnostics and therapy. Furthermore, in this work, we show that by using RENPs, it is possible to create nanosystems with decoupled diagnostic and therapeutic functions, controlled by different wavelengths of light. Such separation ensures that no additional processes will take place during the diagnosis of the tumour and damage to healthy tissues will be avoided.

In this work, two different types of nanomaterials – Au NCs and RENPs-PS complexes are investigated. The aim is to evaluate the theranostic potential of these substances using model systems of cancer cells *in vitro*. Also, the obtained results are discussed, the advantages and disadvantages of each system are compared.

1.1. Aim and tasks

The aim:

To investigate the potential application of biocompatible gold nanoclusters and functionalized rare earth metal nanomaterials in cancer theranostics.

Main tasks:

1. To investigate the optical and photosensitizing properties of protein-stabilized Au NCs and complexes of RENPs and Ce₆.
2. To determine the patterns of accumulation and distribution of protein-stabilized Au NCs and RENPs-Ce₆ complexes in MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells.
3. To evaluate the photosensitizing effect and theranostic properties of Au NCs stabilized with different proteins on breast cancer cells *in vitro*.
4. To determine the accumulation and distribution of RENPs in the tumour model – MDA-MB-231 cancer cell spheroids.
5. To determine whether RENPs-Ce₆ complexes perform the function of PS in cancer cell monolayers and spheroids, when irradiated with 980 nm laser.
6. To investigate whether the use of skin mesenchymal stem cells improves the transport of RENPs-Ce₆ complex and its PS effect in spheroids of cancer cells MDA-MB-231.

1.2. Scientific novelty and practical value

Various Au NCs have been explored for some time as potential theranostic agents (Cifuentes-Rius et al., 2021; van de Looij et al., 2022). Due to their properties, Au NCs could be adapted for different diagnostic or therapeutic methods (van de Looij et al., 2022). Au NCs are being investigated as an alternative to porphyrin type PS and have shown to generate singlet oxygen (¹O₂) (Ho-Wu et al., 2017). During the doctoral studies, the properties of bovine serum albumin-stabilized Au NCs (BSA-Au NCs) were investigated, and it was shown that BSA-Au NCs can generate not only singlet oxygen, but also other reactive oxygen species (ROS) such as peroxides and peroxytrins

(Poderys et al., 2020). Poderys et al., 2020 publication is the first one which demonstrated Au NCs ability to generate ROS other than $^1\text{O}_2$.

A variety of proteins can be used for Au NCs synthesis (Xie et al., 2009; Dixon and Egusa, 2021). In this study it was shown that Au NCs can be synthesized in human blood plasma, thus creating biocompatible nanoclusters for personalized cancer theranostics (Jarockyte et al., 2022a). Such personalized Au NCs have not been previously described in the scientific literature.

REN-PS complexes are being studied as theranostic agents by several scientific laboratories, however all such theranostic systems described in the literature use only one wavelength for both diagnostics and therapy. This approach is not always suitable, because in some cases it is necessary to perform diagnostic tests before starting PDT. In this work, RENPs, which are composed of different layers with different functions, were studied. The function of each layer is turned on at a separate wavelength. In this way, cancer diagnosis and treatment can be separated in a single nanoparticle (Skripka et al., 2019).

Choosing an appropriate model system is critical for initial *in vitro* studies of NPs. Currently, cell monolayers are considered the gold standard. However, this biological model is too simplistic and does not reflect the complex structure of cancer tissue and the tumour microenvironment. Experimental animals are a more accurate biological model, but it is inappropriate to use animals in the initial stages of research. As an alternative, three-dimensional (3D) cell cultures such as cellular spheroids can be used (Fitzgerald et al., 2015). In cellular spheroids, cell-cell interaction dominates, extracellular matrix is formed, and a diffuse gradient of nutrients and oxygen is present. Small tumours that do not have vesicles exhibit the same characteristics (Costa et al., 2016). Application of cellular spheroids in nanomaterial research is growing, but cell monolayers are still preferred by most researchers. Therefore, it is very important to expand the use of cellular spheroids. In this work, it was chosen to perform a part of the experiments in cellular spheroids. The obtained results showed that the penetration of NPs in cellular spheroids is limited, more NPs accumulated in the surface layers of spheroids, and NPs did not penetrate into the central part. Thus, an alternative way to transport NPs has been investigated.

In this work, the ability of skin-derived mesenchymal stem cells (MSCs) to deliver NPs to cancer cell spheroids is investigated. Previous studies have shown that MSCs have the ability to deliver NPs to the tumour and thereby improve anticancer effects (Dapkute et al., 2021). MSCs isolated from bone marrow or adipose tissue are mostly described in the literature. The studies

with skin-derived MSCs have been started recently, so this work contributes to the knowledge of skin MSCs. There are only very few studies examining MSCs migration into cellular spheroids (Ferreira et al., 2021) and none using MSCs isolated from the skin.

Main arguments:

1. Blood serum proteins stabilized gold nanoclusters generate active oxygen and nitrogen forms under the visible light irradiation, while photosensitizer-functionalized rare earth metal nanoparticles generate singlet oxygen when irradiated with near-infrared light.
2. Blood serum proteins stabilized gold nanoclusters and photosensitizer-functionalized rare earth metal nanoparticles accumulate in cancer cells and are non-toxic in the dark.
3. Blood serum proteins stabilized gold nanoclusters accumulate in cancer cells and generate ROS under visible light, which initiate the death of cancer cells.
4. The penetration of photosensitizer-functionalized rare earth metal nanoparticles into three-dimensional cell spheroids is limited.
5. Photosensitizer-functionalized rare earth metal nanoparticles in cell monolayers and spheroids under 980 nm irradiation generate singlet oxygen, which causes cancer cell death.
6. Mesenchymal stem cells accumulate $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ complexes and ensure their transportation into 3D cell spheroids, which was used as a tumour model.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of nanoparticles

2.1.1. Gold nanoclusters

Synthesis of all Au NCs was performed by Vilius Poderys in, National Cancer Institute.

BSA-Au NCs were synthesized according to Xie et al. (2009) by mixing tetrachlorauric acid (HAuCl_4) (Sigma-Aldich) with BSA (Sigma-Aldich) and then adding sodium hydroxide (NaOH) (Sigma-Aldich) as a reducing agent in the final step. Full synthesis protocol is described in Poderys et al., 2020.

Synthesis procedure of plasma protein stabilized gold nanoclusters was performed using a similar protocol. Human plasma (blood group O (Rh⁺ and Rh⁻)) was acquired from Lithuanian national blood centre. Full synthesis protocol is described in Jarockyte et al., 2022a.

2.1.2. Rare earth metal-doped nanoparticles

The synthesis, modification and preparation of RENPs for experiments was carried out by Dr. Artiom Skripka in National Institute of Scientific Research in Quebec City Canada. The head of scientific group is prof. Fiorenzo Vetrone. RENPs investigated in this work were synthesized using the thermal decomposition method. Full synthesis protocol is described in the publication by Skripka et al., 2019.

2.2. Characterization of nanoparticles

2.2.1. Spectroscopy

The steady state absorption UV-visible absorption spectrometer Varian Carry 50 (Varian Inc., Australia). Au NCs photoluminescence (PL) and emission of RENPs were measured with FLS 920 spectrometer (Edinburgh Instruments Ltd., Scotland). Fluorescence decay measurements were performed using FLS 920 spectrometer as well, by using the time correlated single photon counting technique. All spectral measurements were performed in 1 cm path length quartz cells (Hellma Optik GmbH, Germany).

2.2.2. Hydrodynamical size measurements

A hydrodynamic diameter of particles was measured using the dynamic light scattering technique. Samples were measured using particle size and zeta potential analyser Zeta Plus PALS (Brookhaven Inc., USA).

2.2.3. Investigation of reactive oxygen species generation

The singlet oxygen indicator SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green) (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) was used for the evaluation of ¹O₂ generation. This reagent exhibits exceptional sensitivity to singlet oxygen and other reactive oxygen species such as hydroradicals or superperoxides. Dihydrorhodamine 123 – DHR123 (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) was used to determine the peroxides formed in the irradiated samples.

2.3. Experiments with cells

2.3.1. Cancer cell lines

As a model *in vitro* system for cellular experiments, we have chosen two human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 (purchased from the European Collection of Cell Cultures and American Type Culture Collection, respectively). Cells were cultured in a Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (P/S) (all from Gibco, USA). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % of CO₂. The cells were routinely subcultured 2–3 times a week in 25 cm² cell culture flasks.

2.3.2. MSCs isolation and culturing

MSCs were isolated from donor skin tissues left as medical waste after blepharoplasty. The study was approved by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (approval no. 158200-18/6-1036-548); donors were informed and signed a written consent form. MSCs were extracted using explant cell culture according to protocol from Dapkute et al., 2021. Isolated MSCs were plastic-adherent and had 100 % expression of the International Society for Cellular Therapy-defined mesenchymal markers CD90, CD73, and CD105, whereas expression of hematopoietic markers (CD45, CD34, and CD14) was lower than 5 %. Finally, MSCs were verified by induced trilineage differentiation to adipocytes, osteocytes, and chondrocytes.

MSCs were cultured in DMEM supplemented with F12 nutrient mixture (DMEM/F12, 3:1 v/v), 10 % FBS and 1 % P/S. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % of CO₂. The cells were routinely subcultured 2–3 times a week in 75 cm² cell culture flasks.

2.3.3. Accumulation of nanoparticles in cells

The accumulation of NPs was observed using a Nikon Eclipse Te2000-S C1 Plus laser scanning confocal microscope (Nikon, Japan) equipped with 405 nm (Melles Griot, USA), 488 nm (Melles Griot, USA) and 980 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd., China) continuous wave lasers. Imaging was performed using 60×/1.4 SA oil immersion objective (Nikon, Japan). The three-channel RGB detector filters (band-pass filters 450/17, 545/45 and 688/67 for blue, green and red channels, respectively) were used. Hoechst 33258 was excited at 404 nm, Au NCs were excited at 488 nm, RENPs were excited at 980 nm. Image processing was

performed using the Nikon EZ-C1 Bronze version 3.80 and ImageJ 1.8.0_172 software.

2.3.4. Cytotoxicity evaluation

Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, USA) was used to evaluate dark cytotoxicity of NPs. The concentration of extracellular lactate dehydrogenase (LDH) was quantified by measuring absorbance at 490 and 630 nm wavelength with plate-reading spectrophotometer (BioTek, USA). After obtaining absorbance values, they were recalculated as percentage values of cytotoxicity, according to the protocol. For better data representation estimated cytotoxicity (%) was recalculated to viability of cells ($100\% - \text{cytotoxicity}(\%)$). Data was expressed as mean \pm standard deviation. The statistical significance of differences between studied groups was assessed using a two-tailed independent Student's t-test at the 95 % confidence level. Significance was represented as p-value < 0.05 .

2.3.5. Evaluation of photodynamic effect

The efficacy of PDT using Au NCs or RENPs was first investigated in cell monolayers. MDA-MB-231 and MCF-7 cells were seeded in glass-bottom 8-well plates (Lab-Tek, ThermoFisher, USA). $3 \cdot 10^4$ cells were seeded per well. After 24 h, DMEM was aspirated and a new DMEM with Au NCs or RENPs was added. In control wells, DMEM of the cells was replaced. The cells were left in the incubator for 24 h

The next day, cells with Au NCs were exposed to a MAX-302 xenon lamp (Asahi Spectra, Japan) using an interference filter (400/10 nm). The lamp illumination power density was 30 mW/cm^2 , and the irradiation doses ranged from 20 J/cm^2 to 60 J/cm^2 .

In experiments with RENPs, cells were exposed to 980 nm laser radiation. Depending on the experiment, the laser power density was 500 mW/cm^2 or 900 mW/cm^2 and the collected irradiation dose was 450 J/cm^2 or 900 J/cm^2 .

Fluorescent dyes were used to mark live and dead cells: green-fluorescent calcein-AM ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, Thermo Fisher, USA) for the indication of the intracellular esterase activity, and red-fluorescent etidium homodimer-1 ($\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$, Thermo Fisher, USA) or propidium iodide ($\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$, ROTH, Germany) for the indication of the loss of plasma membrane integrity. The survival of exposed and control cells after staining with fluorescent dyes was assessed using a laser scanning confocal microscope. Imaging was performed using $20\times/0.5 \text{ SA}$ objective (Nikon, Japan). The three-channel RGB detector

filters (band-pass filters 450/17, 515/15 and 604/35 for blue, green and red channels, respectively) were used.

The phototoxicity was additionally quantified by counting viable and non-viable cells from obtained confocal imaging pictures, using ImageJ software. The viability of cells was calculated by dividing the number of viable cells by the number of all cells. The data of cell viability was presented as the mean values of viability \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's t-test; differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

2.3.6. Formation of 3D cellular cultures

Three-dimensional spheroid cell cultures were formed using two methods: the hanging drop method by using special 96-well hanging drop plates (Biomatrix, USA) and the forced flotation method by using U-shaped 96-well plates (Nunclon Sphera, Thermo Fisher Scientific, Japan). For three-dimensional cell culture studies, only MDA-MB-231 cells were used, as MCF-7 cells do not form solid cell spheroids, only cell aggregates (Jarockyte et al., 2018).

2.3.7. Experiments with cellular spheroids

Accumulation of LiYF₄-Ce₆ in MDA-MB-231 cell spheroids, MDA-MB-231 cell spheroids were incubated for 24 h with NPs. Cell nuclei were stained with 20 μ g/ml Hoechst 33258.

For PDT effect of LiYF₄-Ce₆ evaluation in MDA-MB-231 spheroids, the spheroids were incubated with LiYF₄-Ce₆ (control spheroids with LiYF₄) for 24 h and then irradiated, replicating the conditions used in the cell monolayer studies. 24 h after irradiation, cell spheroids were stained with the viability dyes calcein AM and ethidium homodimer-1 (Thermo Fisher, USA).

In order to evaluate MSCs migration in MDA-MB-231 spheroids, MDA-MB-231 spheroids were stained with 20 μ g/ml Hoechst 33258 for 24 h while MSCs were separately incubated with 0.1 mg/ml LiLuF₄. At the end of the incubation (30 min left), MSCs were stained with 2 μ M calcein-AM (Thermo Fisher Scientific, USA). Later, the MSCs were added onto MDA-MB-231 spheroids and left in the incubator for 24 h.

To evaluate the PDT effect of LiLuF₄-Ce₆ in MDA-MB-231 spheroids, firstly, MSCs were incubated with LiLuF₄-Ce₆ for 24 h and then MSCs were added onto MDA-MB-231 spheroids. After incubation, spheroids were irradiated, replicating the conditions used in the cell monolayer studies. 24 h after irradiation, cell spheroids were stained with the viability dyes.

3. Results

3.1. Protein stabilized gold nanoclusters

3.1.1. Characterization and ROS generation

The absorption spectra of protein stabilized BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs has a band with a maximum at 280 nm, which coincides with tryptophan amino acid absorption of proteins. The PL spectra of BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs are similar to other protein-stabilized Au NCs and have two PL bands at around 470 nm and 650 nm. PL excitation spectra of BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs exhibit the peak at around 495 nm. Since absorption and PL excitation do not coincide for the Au NCs, we can affirm that both, photoluminescent and non-photoluminescent, species were formed during the synthesis of Au NCs. Overall, despite slight shifts in wavelength of band maxima for absorbance, PL and PL excitation, these spectra are typical for protein stabilized Au NCs (Xie et al., 2009).

The hydrodynamic size measurements showed that the size of BSA-Au NCs in deionized water is 4-16 nm, and that most particles are 9.4 nm in size. From previous studies, it is known that the hydrodynamic size of BSA molecules is 6-8.3 nm (Poderys et al., 2016), and the size of the nanocluster of 25 Au atoms inside the protein itself is less than 1 nm (Xie et al., 2009).

The average size of Au NCs synthesized in human blood plasma was about 12 nm – slightly larger than BSA-Au NCs. The size of the nanoclusters did not differ regardless of whether Rh⁺ or Rh⁻ blood plasma was used in the synthesis. The hydrodynamic size of human serum albumin (HSA) is reported in the literature to be 7 nm, and the size of HAS-Au NCs increases to 12 nm (Russell et al., 2016).

PL decay lifetimes were measured upon 405 nm excitation. The Au NCs PL (at 650 nm) decay was approximated by three exponential decay functions with short ($\tau_1 = \sim 5$ ns), intermediate ($\tau_2 = \sim 200$ ns) and long ($\tau_3 = \sim 1,7$ μ s) lifetimes. It was proposed that the short PL decay component is related to prompt fluorescence of Au NCs in the albumin surrounding, whereas the long PL decay component is related to delayed fluorescence of Au NCs (Yu et al., 2012). Long lived PL excited state of Au NCs makes highly favourable conditions for the generation of various radicals (ROS and ¹O₂).

In order to evaluate Au NCs capability to generate ¹O₂ and ROS upon light irradiation, two fluorescent sensors were chosen: SOSG for ¹O₂ detection and DHR123 for peroxide and peroxyxynitrite detection. Ce₆ was used as a positive control. The increase of fluorescence intensity of DHR123 was detected under irradiation with 405 nm laser light in samples with different Au NCs. This

demonstrates the generation of ROS by Au NCs. On the other hand, there was no increase in the fluorescence intensity of DHR123 in non-irradiated samples. This shows that ROS were not generated without light. The fluorescence of SOSG increased in all irradiated samples, though the rate of increase was different, which shows that generation efficacy of the $^1\text{O}_2$ is different. Ce_6 generates $^1\text{O}_2$ very quickly, compared to Au NCs, however, the maximum amount of $^1\text{O}_2$ is very similar to the amount which is generated by Au NCs after longer irradiation. Additionally, we observed that human plasma itself also generates $^1\text{O}_2$ upon light exposure, which could be easily explained by the presence of endogenous PS, such as uroporphyrin, copro-porphyrin and protoporphyrin, in plasma (With, 1977).

Thus, Au NCs stabilized with BSA or plasma proteins can generate ROS under 405 nm light irradiation. Additionally, we identified that Au NCs more efficiently generate other ROS rather than $^1\text{O}_2$, as evidenced by a higher DHR123 fluorescence intensity increase.

3.1.2. Accumulation in cells and biocompatibility

Accumulation of Au NCs was investigated in live breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 by imaging with laser scanning confocal microscope. BSA-Au NCs, Rh^+ -Au NCs and Rh^- -Au NCs accumulate in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. From combined confocal fluorescence and transmission microscopy images, we can state that Au NCs were clustered in the cytoplasm of the cells, often near the nuclei, but not inside the nuclei. The Au NCs were not distributed homogenously in the cells, but clustered in some compartments, probably vesicles, such as endosomes or lysosomes. Our previous study demonstrated that BSA-Au NCs internalize into cells via endocytosis (Matulionyte ir kt., 2017). Also, a small amount of Au NCs aggregates/agglomerates could form in the incubation medium and then enter cells via micropinocytosis mechanism, leading to appearance of bright large clusters visible inside the cells. Additionally, the Au NCs uptake pattern was similar in both, MCF-7 and MDA-MB-231, cell lines.

Though confocal imaging did not show any obvious damage of the cells after treatment with Au NCs, the cell viability was assessed after dark treatment with various concentrations of Au NCs. The lowest concentration (2.75 mg/ml) had no effect on cell viability, regardless of which Au NCs were used. After incubation with 5.5 mg/ml solutions, BSA-Au NCs had no statistically significant effect on cell viability, while only a slight decrease in cell viability was observed when incubated with Rh^+ -Au NCs and Rh^- -Au NCs. Only a slight decrease of cell viability was observed after incubation

with 13.75 mg/ml concentration, though MCF-7 cells were more affected compared to MDA-MB-231 cells. However, even after treatment with 27.5 mg/mL Au NCs, viability of cells remained at around 90 %, which allowed to conclude, that BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs are non-toxic for MCF-7 and MDA-MB-231 cells under the dark treatment conditions.

3.1.3. PDT effect in cells

In order to evaluate the photodynamic effect of Au NCs in the cells, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were incubated with Au NCs and then irradiated with blue light (400/10 nm bandpass filter, power density of 30 mW/cm²). After irradiation the cells were stained with fluorescent viability dyes calcein AM, which stains live cells, and propidium iodide, which stains nuclei of dead cells.

Cells that were incubated with BSA-Au NCs showed a significant decrease in cell viability when exposed to 400/10 nm light up to a dose of 35.7 J/cm². MCF-7 cell viability dropped to 13 %, while MDA-MB-231 cell viability dropped to 52 %.

During experiments with plasma protein stabilized Au NCs, different irradiation doses were tested to identify optimal irradiation conditions as well as to determine if the photodynamic effect is dose dependent. Viability of cells without nanoclusters after irradiation with 60 J/cm² dose remained unaffected with calculated average viability of both MCF 7 and MDA-MB-231 cells higher than 96 %. The same case is for the cells which were incubated with Au NCs but were not irradiated with 400/10 nm light. The average viability of all those samples was 97 % or higher. After irradiation with a 20 J/cm² dose, the viability of cells, incubated with Au NCs slightly decreases. The calculated viability of cells incubated with Rh⁺-Au NCs was a little bit lower (MCF-7 – 93 %, MDA-MB-231 – 88 %), compared to the cells pre-incubated with Rh⁻-Au NCs (both 96 %). However, statistical analysis did not show any statistically significant differences between the viability of cells incubated with Rh⁺-Au NCs or Rh⁻-Au NCs. On the other hand, differences appear after a higher irradiation dose. First, both Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs had a higher phototoxic effect for MCF-7 cells than for MDA-MB-231 cells. The viability of MCF-7 cells after irradiation with 40 J/cm² dose decreased to 17 % and 27 % when incubated with Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs, respectively. After 60 J/cm² exposure, all MCF-7 cells were dead. Meanwhile, the viability of MDA-MB-231 cells after irradiation with the 40 J/cm² dose remained 77 % and 87 % when incubated with Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs, respectively. After a higher dose (60 J/cm²) 38 % (Rh⁺-Au NCs) and 31 % (Rh⁻-Au NCs)

of MDA-MB-231 cells survived. Another statistically significant difference between Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs was observed: Rh⁺-Au NCs were more phototoxic compared to Rh⁻-Au NCs.

3.2. Rare earth metal-doped nanoparticles

3.2.1. RENPs and Ce₆ complex formation and characterization

Emission spectra of LiYF₄ nanoparticles and the absorption spectra of Ce₆ partially overlap. Hence, upon excitation of LiYF₄ at 980 nm, their emitted UV and visible light can be absorbed by Ce₆ molecules. Absorption spectrum of Ce₆ changes when it binds to the surface of LiYF₄ nanoparticles and forms a complex – Soret band is shifted by 1 nm and the Q(I) band by 3 nm to the longer wavelengths. This shift occurs due to microenvironment change of Ce₆ molecules and confirms that complex has formed (Valanciunaite et al., 2010).

The overlap of LiLuF₄ emission spectrum is even more suitable for Ce₆ excitation – more spectral bands overlap. The emission bands of LiLuF₄ at 376 nm and 406 nm overlap with the Soret band, and the 652 nm and 668 nm bands overlap with the Q(I) band. In addition, comparing the emission spectra of LiLuF₄ with the LiLuF₄-Ce₆ complex, it can be observed that 668 nm emission band of LiLuF₄ broadens after complexation. Upon 405 nm excitation, the fluorescence of Ce₆ in the complex coincides with the band broadening seen upon excitation of LiLuF₄-Ce₆ with 980 nm radiation. It can also be observed that the fluorescence band of Ce₆ in the complex has shifted compared to the fluorescence of free Ce₆. This shift is due to the Ce₆ molecule microenvironment change and confirms that Ce₆ attached to the polymer covering the LiLuF₄ nanoparticles.

The hydrodynamic diameter of LiYF₄ nanoparticles is 128 ± 10 nm, and of LiYF₄-Ce₆ complex is 133 ± 3 nm. Meanwhile, LiLuF₄ nanoparticles are more than twice as small, with a hydrodynamic diameter of 50 ± 11 nm, while LiYF₄-Ce₆ complex is 52 ± 13 nm. Smaller size of nanoparticles may lead to better penetration into cells. The optimal size of nanoparticles for cell entry is 40-50 nm (Jiang et al., 2008; Hoshyar et al., 2016). On the other hand, to prevent the immune system from removing nanoparticles from the bloodstream to the liver or spleen, their size should not exceed 200 nm (Zhang et al., 2021b). Based on hydrodynamic size measurements alone, both LiYF₄ and LiLuF₄ nanoparticles are suitable for further studies in biological systems as they do not exceed 200 nm in size.

SOSG was used to determine ¹O₂ generation. Aqueous solutions with LiYF₄, Ce₆ and LiYF₄-Ce₆ solutions were irradiated with 980 nm or 806 nm laser radiation. Ce₆ irradiated with 980 nm laser radiation did not generate ¹O₂

at all. Irradiation of LiYF₄ produced a small amount of ¹O₂, which may have occurred due to the indirect excitation of SOSG during irradiation. During the irradiation of the LiYF₄-Ce₆ complex, a significantly higher amount of ¹O₂ was generated, compared to samples containing only LiYF₄ nanoparticles without Ce₆. Since 980 nm radiation is only absorbed by LiYF₄, we can say that the resulting Ce₆ successfully absorbs the light emitted by LiYF₄. Solutions, excited with 806 nm laser did not produce ¹O₂. Hence, neither the LiYF₄ themselves nor the LiYF₄-Ce₆ complex generated ¹O₂ under 806 nm radiation meaning this radiation can be used to realize the diagnostic properties of LiYF₄-Ce₆.

A study of ¹O₂ generation by LiLuF₄ and LiLuF₄-Ce₆ was performed. In this case, the control samples with LiLuF₄, LiLuF₄-Ce₆ and Ce₆ were kept in the dark, and the experimental samples were irradiated with 980 nm until fluorescence intensity maximum of SOSG was reached. SOSG fluorescence intensity grew only in those samples containing LiLuF₄-Ce₆ complex, unlike LiYF₄, LiLuF₄ nanoparticles themselves did not generate ¹O₂ during irradiation. In the samples with LiLuF₄-Ce₆ complex, SOSG fluorescence increased more than 6 times, after collecting 1860 J/cm² dose and later irradiation did not increase the fluorescence anymore. Meanwhile, in samples with LiYF₄-Ce₆, SOSG fluorescence intensity increased more than 9 times after a similar irradiation dose.

3.2.2. Uptake in cells and biocompatibility

Accumulation of LiYF₄, LiYF₄-Ce₆, LiLuF₄ and LiLuF₄-Ce₆ in breast cancer cells was assessed after 24 h incubation by confocal microscopy. Cells were incubated with RENPs for 24 h, then fixed and stained with fluorescent dyes before imaging. RENPs accumulated in cells and were located in vesicles near the cell nuclei. There were no RENPs inside nuclei. The cellular accumulation of these RENPs is consistent with the typical cellular accumulation of RENPs described in other publications (Baziulyte-Paulaviciene et al., 2017; Voronovic et al., 2021; Klimkevicius et al., 2022).

LiYF₄, LiYF₄-Ce₆, LiLuF₄ and LiLuF₄-Ce₆ biocompatibility was evaluated using released LDH detection kit. Results showed that RENPs themselves and their complexes with Ce₆ did not cause toxic effects on cells when cells were kept in the dark. The viability of MCF-7 cells after exposure to RENPs was unchanged and remained the same as control cells. The viability of MDA-MB-231 cells decreased to 95 % after 24 h incubation with LiYF₄ and LiYF₄-Ce₆. LiLuF₄ and LiLuF₄-Ce₆ had no statistically significant effect on

MDA-MB-231 cell viability. Thus, LiYF_4 , $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$, LiLuF_4 and $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ are biocompatible and do not cause any cytotoxicity in the dark.

3.2.3. Experiment with cellular spheroids

The accumulation of LiYF_4 and $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ was also investigated in MDA-MB-231 cell spheroids. The results showed that both LiYF_4 and $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ accumulated in the surface cells of the spheroids. Meanwhile, the fluorescent nuclei penetrated to the central part of the spheroids. Thus, the penetration of LiYF_4 and $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ into the cellular spheroid is limited.

Later MDA-MB-231 cell spheroids incubated with LiYF_4 and $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ were irradiated with a 980 nm or 806 nm laser (0.5 W/cm^2) up to 900 J/cm^2 dose. The spheroids that were incubated with $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ and irradiated with 980 nm radiation, were damaged and surface cells died, while other cells remained viable. Thus, only cells with accumulated $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ died and other cells were not damaged. Irradiation with 806 nm had no effect on cell viability. Likewise, spheroids that were incubated with LiYF_4 remained viable. This study confirms the results obtained in cell monolayers and that $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ can be used safely as a diagnostic tool under 806 nm irradiation and as a photodrug under 980 nm irradiation.

To improve the delivery of nanoparticles, MSCs have been investigated as a potential carrier of RENPs. First, the accumulation of LiLuF_4 and $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ in MSCs was investigated. RENPs accumulated in the cytoplasm of MSCs, most of them close to the nuclei, but RENPs did not enter the nuclei. No differences in accumulation and localization between LiLuF_4 and $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ were observed.

LDH cytotoxicity assay demonstrated that after 24 h of incubation with RENPs, there was no statistically significant effect on the viability of MSCs compared to control cells. Thus, LiLuF_4 and $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ are not toxic to MSCs in the dark and can be transported using MSCs.

Firstly, therapeutic potential of $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ were investigated in cell monolayers. Two-dose irradiation with 980 nm was performed based on the hypothesis that during the first irradiation, MSCs, pre-incubated with $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$, will die due to the generated $^1\text{O}_2$, then $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ will be released to the surrounding medium. The $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ then will accumulate in the cancer cells, which would die after the second irradiation. The same irradiation scheme was used in previous studies with a complex of quantum dots and Ce_6 (Dapkute et al., 2021). Results showed that one irradiation dose is enough to damage MSCs – after the first irradiation all MSCs were dead. Meanwhile, the viability of coculture of MSCs and MCF-7 cells decreased to

61 %, and that of coculture of MSCs and MDA-MB-231 decreased to 79 %. After the second irradiation, the viability of MSCs and cancer cell cocultures were reduced: cell viability of MSCs and MCF-7 coculture decreased to 30 % while in MSCs and MDA-MB-231 coculture – decreased to 44 %. These results indicate that MCF-7 were more affected than MDA-MB-231 cells. After analogous two-dose irradiation of MSCs preincubated with LiLuF₄, no significant decrease in viability was observed both after the first and the second irradiations.

In order to evaluate the ability of MSCs to migrate in tumours, a 3D cell culture model was chosen – MDA-MB-231 cell spheroids. Experimental result demonstrated that MSCs migrated and penetrated into the interior of the spheroid after 24 h. Additionally, MSCs delivered RENPs to the MDA-MB-231 cell spheroids. Later studies demonstrated that LiLuF₄-Ce₆ delivery with MSCs improved PDT effect in MDA-MB-231 spheroids.

4. Discussion

This thesis describes studies with Au NCs and RENP-Ce₆ complexes. Three different protein-coated Au NCs were investigated: BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs, and Rh⁻-Au NCs. LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ and LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ and their complexes – LiYF₄-Ce₆ and LiLuF₄-Ce₆ were also investigated. Firstly, all NPs were optically characterized, the sizes of NPs and the ability to generate ROS were measured. Later, studies were carried out with cell monolayers: the accumulation of NPs in cells, biocompatibility, photosensitizing effect were evaluated. Additionally, studies with cell spheroids were performed to investigate the performance of RENPs in a more complex model system. The transport of RENPs using MSCs was also investigated. The results of the conducted studies showed that the investigated NPs have the potential to be applied to cancer theranostics, but each system has its own advantages and disadvantages, which were discussed in more detail.

Theranostic NPs can be used for fluorescent diagnostics and PDT in two ways: the NPs themselves could be used as PS or the NPs could be conjugated with PS (Tavakkoli Yaraki et al., 2022). Here, Au NCs were selected as the most promising candidates to become next-generation PS. PS mainly generate ¹O₂ (about 95 % of all ROS) and only a small amount of other ROS. However, the mechanisms of ROS generation by nanoparticles, including Au NCs, are quite different from porphyrin-type PS, so it is important to study the generation of other ROS as well. In this work, it was shown for the first time that Au NCs can generate not only ¹O₂ but also peroxides and peroxy nitrates

(Poderys et al., 2020). Compared to the Ce₆, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs generate at least twice as much of these ROS than Ce₆, with ROS generation ratios of 2.7 and 2.3, respectively (Jarockyte et al., 2022). Although Ce₆ generates ¹O₂ faster and more efficiently during irradiation (Au-NCs generates, but more slowly – a higher irradiation dose is required) (Fig. 21), the total formation of all ROS is the same or even higher, thus Au NCs is equivalent to porphyrin-type PS and has a potential to replace them in the future.

LiYF₄-Ce₆ and LiLuF₄-Ce₆ complexes also generate ¹O₂, although in this case the mechanism of ROS generation is much more complicated. UCNPs are excited by 980 nm laser and upconversion process is initiated, then UCNPs emit visible light, which is absorbed by Ce₆, which generates ¹O₂. Förster resonance energy transfer between UCNPs and Ce₆ has not yet been demonstrated, so currently light emission and absorption are assumed to occur. Several processes take place and energy losses occur during each process, additionally, 980 nm radiation has lower energy compared to visible light, therefore high irradiation doses are required. On the other hand, if the dose is chosen correctly, 980 nm radiation has no effect to the tissues. However, an excessive irradiation could lead to thermal damage, since 980 nm radiation is absorbed by water, this must be taken into account before application.

Both Au NCs and RENPs are biocompatible and do not cause dark toxicity. However, one of the disadvantages of Au NCs is that during fluorescence imaging, Au NCs are excited with the same light which initiates ROS generation. This drawback can be overcome by choosing alternative imaging methods. Au NCs can be used for X-ray or CT imaging (Kubiliute et al., 2011; Zhang et al., 2012; Cole et al., 2015), and Au NCs generate third harmonic, so they can be imaged by nonlinear microscopy (Jarockyte et al., 2022a). The LiYF₄-Ce₆ and LiLuF₄-Ce₆ complexes do not have this problem because the particles are designed to use one wavelength (793 nm or 806 nm) for diagnostics and the other (980 nm) for PDT. RENPs with decoupled diagnostic and therapeutic function is a novelty in a cancer theranostic field (Skripka et al., 2019). Typically, both diagnosis and therapy occur by exciting the NPs using same wavelength, or different imaging techniques are used to avoid unwanted photosensitizing effects. In this work, the application of RENP-Ce₆ complexes for PDT is more emphasized compared to diagnostics, because due to the lack of technical capabilities, the possible use for diagnostics by excitation with 793 nm or 806 nm radiation was not shown. Such studies will be carried out in the near future.

Studies with plasma protein-stabilized Au NCs showed that the PDT effect depends on the irradiation dose. It was observed that at a lower dose of irradiation, the morphology of the cells changes and apoptosis starts, while at a higher dose, cell necrosis occurs. Therefore, when applying a lower dose of radiation, the cells initiate the process of apoptosis due to the intracellular damage, while after irradiation with a higher dose, the cells are unable to adapt to the damage and necrosis occurs. Additionally, MCF-7 cells were observed to be affected more than MDA-MB-231 cells.

The phototoxicity of $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ and $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ complexes was investigated with higher irradiation doses (900 J/cm^2 and 450 J/cm^2 compared to $20\text{-}60 \text{ J/cm}^2$ used for Au NCs). PDT effect of $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ was significantly lower compared to $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$. In LiYF_4 NPs, the core of the NP is responsible for the upconversion process, thus excitation of Ce_6 could be less effective. LiLuF_4 NPs were intentionally designed with upconversion layer in the surface. However, it should be noted that when studying the phototoxicity of the $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ complex in cells, the laser light was directed to the samples using an optical fiber and the final laser power density was 500 mW/cm^2 . Meanwhile, when the $\text{LiLuF}_4\text{-Ce}_6$ complex was investigated, the laser light was directed by mirrors, resulting in a final laser power density of 900 mW/cm^2 . Since the upconversion is a nonlinear process, the power density of the exciting laser radiation significantly increases the upconversion efficiency, resulting in an increase in the excitation of Ce_6 molecules, ROS generation and PDT effects on cells.

Although RENP-Ce_6 complexes require higher irradiation doses than Au NCs, RENP-Ce_6 complexes can be used for PDT of tumors in deeper layers. The blue light, used to excite Au NCs in this work, is absorbed by tissues, but Au NCs have a broad PL excitation spectrum and can be excited by longer wavelength radiation. On the other hand, 980 nm radiation will still be more penetrating than the visible light needed to excite Au NCs. Hence, Au NCs are more suitable for PDT of superficial tumors, and RENPs-Ce_6 complexes can be used more universally.

The accumulation and distribution of LiYF_4 nanoparticles in MDA-MB-231 cell spheroids is similar to the accumulation of carboxylated quantum dots (Jarockyte et al., 2018). LiYF_4 and $\text{LiYF}_4\text{-Ce}_6$ were located on the surface of the cell spheroid and did not penetrate into the centre. Due to such distribution, the outer cells are primarily affected during PDT, while the cells located in the central part of the spheroid are protected from phototoxic effects. Hence, the cancerous cells in the centre of the tumour would also not be affected, but only the superficial ones. In order to improve the delivery of NPs into the spheroid, MSCs were investigated as a NPs carrier. During the

experiments, it was demonstrated that MSCs can penetrate into the centre of the MDA-MB-231 spheroids and transfer LiLuF₄ nanoparticles. Such LiLuF₄-Ce₆ complex transportation also increased the PDT effect on MDA-MB-231 cell spheroids. Thus, the use of MSCs for NPs delivery can enhance the anticancer effect on tumours.

In order to expand the use of both Au NCs and RENPs, it is possible to use them as contrast agents in clinical diagnostic methods. For example, radioactive technetium can be attached to BSA-Au NCs and such conjugate can be used as a contrast agent in single photon emission computed tomography (Jarockyte et al., 2022b). RENPs described in this work contain Nd³⁺ ions in their composition, which would allow to use them as MRI contrast markers (Zhao et al., 2021). It would be possible to obtain multimodal imaging and expand the possibilities of diagnostic methods currently used in the clinic.

5. Conclusions

1. BSA-Au NCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs generate ROS under visible light irradiation. Meanwhile, the complexes formed by LiYF₄:Tm³⁺,Yb³⁺@LiYF₄@LiYF₄:Nd³⁺ or LiLuF₄:Nd³⁺@LiLuF₄@LiYbF₄:Er³⁺@LiLuF₄ NPs and Ce₆ generate ¹O₂ when irradiated in the tissue transparency window with 980 nm laser.
2. BSA-Au NNCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs as well as LiYF₄-Ce₆ and LiLuF₄-Ce₆ complexes accumulate in MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cells and do not affect the viability of these cells in the dark.
3. BSA-Au NNCs, Rh⁺-Au NCs and Rh⁻-Au NCs generate ROS and cause PDT effect in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. This effect is not uniform between cells of different malignancies: MCF-7 cells are more affected than MDA-MB-231 cells.
4. Penetration of LiYF₄ and LiYF₄-Ce₆ into MDA-MB-231 spheroids is limited – nanoparticles accumulate only in the surface layers of the spheroid cells.
5. LiYF₄-Ce₆ and LiLuF₄-Ce₆ complexes excited by 980 nm radiation initiate intracellular ¹O₂ generation and cause the death of cancer cells in cell monolayers and spheroids.
6. Skin MSCs transfer LiLuF₄-Ce₆ complexes to MDA-MB-231 cell spheroids and improve PDT effect of the complex.

8. LITERATŪROS ŠARAŠAS / REFERENCES

- Ahmed S, Annu, Ikram S, Yudha S. S.** Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2016**;161:141–53.
- Alphandéry E.** Natural Metallic Nanoparticles for Application in Nano-Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2020**;21(12):4412.
- Ar G, I R, S J, R P, J G, J O ir kt.** Human insulin fibril-assisted synthesis of fluorescent gold nanoclusters in alkaline media under physiological temperature. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **2013**;105:167–72.
- Baddam DO, Ragi SD, Tsang SH, Ngo WK.** Ophthalmic Fluorescein Angiography. *Methods Mol Biol*. **2023**;2560:153–60.
- Barua S, Mitragotri S.** Challenges associated with Penetration of Nanoparticles across Cell and Tissue Barriers: A Review of Current Status and Future Prospects. *Nano Today*. **2014**;9(2):223–43.
- Baziulyte-Paulaviciene D, Karabanovas V, Stasys M, Jarockyte G, Poderys V, Sakirzanovas S ir kt.** Synthesis and functionalization of NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄ core-shell nanoparticles for possible application as multimodal contrast agents. *Beilstein J Nanotechnol*. **2017**;8:1815–24.
- Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC ir kt.** Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell. *Chem Soc Rev*. **2017**;46(14):4218–44.
- Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR.** Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. **2018**;18(3):e264–77.
- Bhushan A, Gonsalves A, Menon JU.** Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2021**;13(5):723.
- Borlan R, Focsan M, Maniu D, Astilean S.** Interventional NIR Fluorescence Imaging of Cancer: Review on Next Generation of Dye-Loaded Protein-Based Nanoparticles for Real-Time Feedback During Cancer Surgery. *Int J Nanomedicine*. **2021**;16:2147–71.
- Cao B, Yang M, Zhu Y, Qu X, Mao C.** Stem cells loaded with nanoparticles as a drug carrier for in vivo breast cancer therapy. *Adv Mater*. **2014**;26(27):4627–31.
- Casas A.** Clinical uses of 5-aminolaevulinic acid in photodynamic treatment and photodetection of cancer: A review. *Cancer Letters*. **2020**;490:165–73.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR.** Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor

localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2005**;2(2):91–106.

Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer.* **2006**;6(7):535–45.

Cattaneo M, Froio A, Gallino A. Cardiovascular Imaging and Theranostics in Cardiovascular Pharmacotherapy. *Eur Cardiol.* **2019**;14(1):62–4.

Chadwick SJ, Salah D, Livesey PM, Brust M, Volk M. Singlet Oxygen Generation by Laser Irradiation of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* American Chemical Society; **2016**;120(19):10647–57.

Chakraborty S, Nandy A, Ghosh S, Das NK, Parveen S, Datta S ir kt. Protein-templated gold nanoclusters as specific bio-imaging probes for the detection of Hg(ii) ions in in vivo and in vitro systems: discriminating between MDA-MB-231 and MCF10A cells. *Analyst.* **2021**;146(4):1455–63.

Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem Rev.* **2014**;114(10):5161–214.

Chen G, Shen J, Ohulchanskyy TY, Patel NJ, Kutikov A, Li Z ir kt. (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ Core/Shell Nanoparticles with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Upconversion for High-Contrast Deep Tissue Bioimaging. *ACS Nano.* American Chemical Society; **2012**;6(9):8280–7.

Chen J, Lu L, feng Y, Wang H, Dai L, li Y ir kt. PKD2 mediates multi-drug resistance in breast cancer cells through modulation of P-glycoprotein expression. *Cancer Letters.* **2011**;300(1):48–56.

Chen Q, Chen J, Yang Z, Zhang L, Dong Z, Liu Z. NIR-II light activated photodynamic therapy with protein-capped gold nanoclusters. *Nano Res.* **2018**;11(10):5657–69.

Chen T-H, Tseng W-L. (Lysozyme Type VI)-Stabilized Au₈ Clusters: Synthesis Mechanism and Application for Sensing of Glutathione in a Single Drop of Blood. *Small.* **2012**;8(12):1912–9.

Cheng T, Marin R, Skripka A, Vetrone F. Small and Bright Lithium-Based Upconverting Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* **2018**;140(40):12890–9.

Chudzik M, Maciążek-Jurczyk M, Pawelczak B, Sułkowska A. Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin. *Molecules.* **2016**;22(1):34.

Cifuentes-Rius A, Deepagan VG, Xie J, Voelcker NH. Bright Future of Gold Nanoclusters in Theranostics. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* American Chemical Society; **2021**;13(42):49581–8.

Cole LE, Ross RD, Tilley JM, Vargo-Gogola T, Roeder RK. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine (Lond).* **2015**;10(2):321–41.

- Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ.** 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*. **2016**;34(8):1427–41.
- Czyżowska A, Barbasz A, Szyk-Warszyńska L, Oćwieja M, Csapó E, Ungor D.** The surface-dependent biological effect of protein-gold nanoclusters on human immune system mimetic cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2021**;620:126569.
- Dai Q, Wilhelm S, Ding D, Syed AM, Sindhvani S, Zhang Y ir kt.** Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors. *ACS Nano*. **2018**;12(8):8423–35.
- Dapkute D, Pleckaitis M, Bulotiene D, Daunoravicius D, Rotomskis R, Karabanovas V.** Hitchhiking Nanoparticles: Mesenchymal Stem Cell-Mediated Delivery of Theranostic Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. **2021**;13(37):43937–51.
- Demann ETK, Stein PS, Haubenreich JE.** Gold as an implant in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants*. **2005**;15(6):687–98.
- Dixon JM, Egusa S.** Common Motif at the Red Luminophore in Bovine Serum Albumin–, Ovalbumin–, Trypsin–, and Insulin–Gold Complexes. *J. Phys. Chem. Lett.* American Chemical Society; **2021**;12(11):2865–70.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D ir kt.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **2006**;8(4):315–7.
- Dong L, Li M, Zhang S, Li J, Shen G, Tu Y ir kt.** Cytotoxicity of BSA-Stabilized Gold Nanoclusters: In Vitro and In Vivo Study. *Small*. **2015**;11(21):2571–81.
- van Dongen GAMS, Visser GWM, Vrouwenraets MB.** Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2004**;56(1):31–52.
- Egloff-Juras C, Bezdetnaya L, Dolivet G, Lassalle H-P.** NIR fluorescence-guided tumor surgery: new strategies for the use of indocyanine green. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Press; **2019**;14:7823.
- El-Sayed N, Schneider M.** Advances in biomedical and pharmaceutical applications of protein-stabilized gold nanoclusters. *J. Mater. Chem. B*. The Royal Society of Chemistry; **2020**;8(39):8952–71.
- Escudero-Francos MA, Cepas V, González-Menéndez P, Badía-Laiño R, Díaz-García ME, Sainz RM ir kt.** Cellular Uptake and Tissue Biodistribution of Functionalized Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **2017**;13(2):167–79.
- Ferreira LP, Gaspar VM, Monteiro MV, Freitas B, Silva NJO, Mano JF.** Screening of dual chemo-photothermal cellular nanotherapies in organotypic breast cancer 3D spheroids. *Journal of Controlled Release*. **2021**;331:85–102.

- Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O' Brien FJ, O' Driscoll CM.** Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release*. **2015**;215:39–54.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. **1970**;3(4):393–403.
- Fuchs J, Thiele J.** The Role of Oxygen in Cutaneous Photodynamic Therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. **1998**;24(5):835–47.
- Gierlich P, Mata AI, Donohoe C, Brito RMM, Senge MO, Gomes-da-Silva LC.** Ligand-Targeted Delivery of Photosensitizers for Cancer Treatment. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2020**;25(22):5317.
- Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T ir kt.** Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences; **2010**;107(3):1124–9.
- Gnach A, Lipinski T, Bednarkiewicz A, Rybka J, Capobianco JA.** Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chem. Soc. Rev*. **2015**;44(6):1561–84.
- Govindaraju S, Roshini A, Lee M-H, Yun K.** Kaempferol conjugated gold nanoclusters enabled efficient for anticancer therapeutics to A549 lung cancer cells. *Int J Nanomedicine*. **2019**;14:5147–57.
- Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S.** Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media SA; **2021**;9.
- Han L, Xia J-M, Hai X, Shu Y, Chen X-W, Wang J-H.** Protein-Stabilized Gadolinium Oxide-Gold Nanoclusters Hybrid for Multimodal Imaging and Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. American Chemical Society; **2017**;9(8):6941–9.
- Han W, Yang W, Gao F, Cai P, Wang J, Wang S ir kt.** Iodine-124 Labeled Gold Nanoclusters for Positron Emission Tomography Imaging in Lung Cancer Model. *J Nanosci Nanotechnol*. **2020**;20(3):1375–82.
- Hartman KB, Wilson LJ, Rosenblum MG.** Detecting and treating cancer with nanotechnology. *Mol Diagn Ther*. **2008**;12(1):1–14.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S ir kt.** Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. **2000**;156(4):1363–80.
- He G, Huang P, Chen X.** Theranostic multimodal gold nanoclusters. *Nat Biomed Eng*. Nature Publishing Group; **2020**;4(7):668–9.

- Hertz B.** A tribute to Dr. Saul Hertz: The discovery of the medical uses of radioiodine. *World J Nucl Med.* **2019**;18(1):8–12.
- Higbee-Dempsey E, Amirshaghghi A, Case MJ, Miller J, Busch TM, Tsourkas A.** Indocyanine Green-Coated Gold Nanoclusters for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Advanced Therapeutics.* **2019**;2(9):1900088.
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA.** Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology.* **2010**;148(1):3–15.
- Holliday DL, Speirs V.** Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research.* **2011**;13(4):215.
- Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G.** The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond).* **2016**;11(6):673–92.
- Ho-Wu R, Yau SH, Goodson T.** Efficient Singlet Oxygen Generation in Metal Nanoclusters for Two-Photon Photodynamic Therapy Applications. *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society; **2017**;121(43):10073–80.
- Hudson DE, Hudson DO, Wininger JM, Richardson BD.** Penetration of Laser Light at 808 and 980 nm in Bovine Tissue Samples. *Photomed Laser Surg.* **2013**;31(4):163–8.
- Yang L, Shang L, Nienhaus GU.** Mechanistic aspects of fluorescent gold nanocluster internalization by live HeLa cells. *Nanoscale.* The Royal Society of Chemistry; **2013**;5(4):1537–43.
- Idée J-M, Louguet S, Ballet S, Corot C.** Theranostics and contrast-agents for medical imaging: a pharmaceutical company viewpoint. *Quant Imaging Med Surg.* **2013**;3(6):292–7.
- Yoo J-O, Ha K-S.** New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. *Int Rev Cell Mol Biol.* **2012**;295:139–74.
- Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M et al.** Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *International Immunopharmacology.* **2011**;11(3):358–65.
- Yu P, Wen X, Toh Y-R, Tang J.** Temperature-Dependent Fluorescence in Au₁₀ Nanoclusters. *J. Phys. Chem. C.* American Chemical Society; **2012**;116(11):6567–71.
- Jain RK, Stylianopoulos T.** Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol.* **2010**;7(11):653–64.
- Jarockyte G, Dapkute D, Karabanovas V, Daugmaudis JV, Ivanauskas F, Rotomskis R.** 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* **2018**;1862(4):914–23.

- Jarockyte G, Karabanovas V, Rotomskis R, Mobasher A.** Multiplexed Nanobiosensors: Current Trends in Early Diagnostics. *Sensors (Basel)*. **2020**;20(23):6890.
- Jarockyte G, Poderys V, Barzda V, Karabanovas V, Rotomskis R.** Blood Plasma Stabilized Gold Nanoclusters for Personalized Tumor Theranostics. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2022a**;14(8):1887.
- Jarockyte G, Stasys M, Poderys V, Buivydaite K, Pleckaitis M, Bulotiene D ir kt.** Biodistribution of Multimodal Gold Nanoclusters Designed for Photoluminescence-SPECT/CT Imaging and Diagnostic. *Nanomaterials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2022b**;12(19):3259.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR ir kt.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. **2002**;418(6893):41–9.
- Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW.** Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotech*. Nature Publishing Group; **2008**;3(3):145–50.
- Jiang X, Du B, Huang Y, Yu M, Zheng J.** Cancer Photothermal Therapy with ICG-Conjugated Gold Nanoclusters. *Bioconjugate Chem*. American Chemical Society; **2020**;31(5):1522–8.
- Josefsen LB, Boyle RW.** Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met Based Drugs*. **2008**;2008.
- Kawasaki H, Yoshimura K, Hamaguchi K, Arakawa R.** Trypsin-stabilized fluorescent gold nanocluster for sensitive and selective Hg²⁺ detection. *Anal Sci*. **2011**;27(6):591–6.
- Kefayat A, Ghahremani F, Motaghi H, Amouheidari A.** Ultra-small but ultra-effective: Folic acid-targeted gold nanoclusters for enhancement of intracranial glioma tumors' radiation therapy efficacy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. **2019**;16:173–84.
- Khalili L, Dehghan G, Sheibani N, Khataee A.** Smart active-targeting of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapeutic applications: Recent advances and challenges. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2022**;213:166–94.
- Khandelia R, Bhandari S, Pan UN, Ghosh SS, Chattopadhyay A.** Gold Nanocluster Embedded Albumin Nanoparticles for Two-Photon Imaging of Cancer Cells Accompanying Drug Delivery. *Small*. **2015**;11(33):4075–81.
- Klimkevicius V, Voronovic E, Jarockyte G, Skripka A, Vetrone F, Rotomskis R ir kt.** Polymer brush coated upconverting nanoparticles with improved colloidal stability and cellular labeling. *J Mater Chem B*. **2022**;10(4):625–36.
- Kratz F, Elsadek B.** Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *Journal of Controlled Release*. **2012**;161(2):429–45.

- Kubiliute R, Slekaite A, Burkanas M, Grigiene R, Rotomskis R.** Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for X-Ray Imaging. Adliene D, sudarytojas. *Medical Physics in the Baltic States*. Kaunas: Kaunas Univ Technology Press; **2011**. p. 27-+.
- Latorre A, Latorre A, Castellanos M, Rodriguez Diaz C, Lazaro-Carrillo A, Aguado T ir kt.** Multifunctional Albumin-Stabilized Gold Nanoclusters for the Reduction of Cancer Stem Cells. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2019**;11(7):969.
- Lauwerends LJ, van Driel PBAA, Baatenburg de Jong RJ, Hardillo JAU, Koljenovic S, Puppels G ir kt.** Real-time fluorescence imaging in intraoperative decision making for cancer surgery. *The Lancet Oncology*. **2021**;22(5):e186–95.
- Le Guével X, Daum N, Schneider M.** Synthesis and characterization of human transferrin-stabilized gold nanoclusters. *Nanotechnology*. **2011**;22(27):275103.
- Li L, Liu X, Fu C, Tan L, Liu H.** Biosynthesis of fluorescent gold nanoclusters for in vitro and in vivo tumor imaging. *Optics Communications*. **2015**;355:567–74.
- Li M, Zhang F, Chen K, Wang C, Su Y, Liu Y ir kt.** Nanoparticles and mesenchymal stem cells: a win-win alliance for anticancer drug delivery. *RSC Adv*. The Royal Society of Chemistry; **2016**;6(43):36910–22.
- Li Q, Zeman CJ, Schatz GC, Gu XW.** Source of Bright Near-Infrared Luminescence in Gold Nanoclusters. *ACS Nano*. American Chemical Society; **2021**;15(10):16095–105.
- Lyons SK, Patrick PS, Brindle KM.** Imaging Mouse Cancer Models In Vivo Using Reporter Transgenes. *Cold Spring Harb Protoc*. **2013**;2013(8):pdb.top069864.
- Liu C-L, Wu H-T, Hsiao Y-H, Lai C-W, Shih C-W, Peng Y-K ir kt.** Insulin-directed synthesis of fluorescent gold nanoclusters: preservation of insulin bioactivity and versatility in cell imaging. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2011**;50(31):7056–60.
- Liu Q, Feng W, Yang T, Yi T, Li F.** Upconversion luminescence imaging of cells and small animals. *Nat. Protocols*. **2013a**;8(10):2033–44.
- Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q ir kt.** CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. **2013b**;32(5):544–53.
- van de Looij SM, Hebels ER, Viola M, Hembury M, Oliveira S, Vermonden T.** Gold Nanoclusters: Imaging, Therapy, and Theranostic Roles in Biomedical Applications. *Bioconjugate Chem*. American Chemical Society; **2022**;33(1):4–23.

- Lu C, Joulin E, Tang H, Pouri H, Zhang J.** Upconversion Nanostructures Applied in Theranostic Systems. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2022**;23(16):9003.
- Luo D, Wang X, Burda C, Basilion JP.** Recent Development of Gold Nanoparticles as Contrast Agents for Cancer Diagnosis. *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2021**;13(8):1825.
- Luo D, Wang X, Zeng S, Ramamurthy G, Burda C, Basilion JP.** Targeted Gold Nanocluster-Enhanced Radiotherapy of Prostate Cancer. *Small*. **2019**;15(34):e1900968.
- Luo M, Zhou Y, Gao N, Cheng W, Wang X, Cao J ir kt.** Mesenchymal stem cells transporting black phosphorus-based biocompatible nanospheres: Active trojan horse for enhanced photothermal cancer therapy. *Chemical Engineering Journal*. **2020**;385:123942.
- Mahalingam V, Vetrone F, Naccache R, Speghini A, Capobianco JA.** Lanthanide Nanocrystals: Colloidal Tm³⁺/Yb³⁺-Doped LiYF₄ Nanocrystals: Multiple Luminescence Spanning the UV to NIR Regions via Low-Energy Excitation (Adv. Mater. 40/2009). *Adv. Mater.* **2009**;21(40):n/a-n/a.
- Matulionyte M, Dapkute D, Budenaite L, Jarockyte G, Rotomskis R.** Photoluminescent Gold Nanoclusters in Cancer Cells: Cellular Uptake, Toxicity, and Generation of Reactive Oxygen Species. *Int J Mol Sci*. **2017**;18(2):E378.
- McCarthy JR, Jaffer FA, Weissleder R.** A Macrophage-Targeted Theranostic Nanoparticle for Biomedical Applications. *Small*. **2006**;2(8–9):983–7.
- McHugh KJ, Jing L, Behrens AM, Jayawardena S, Tang W, Gao M ir kt.** Biocompatible Semiconductor Quantum Dots as Cancer Imaging Agents. *Advanced Materials*. **2018**;30(18):1706356.
- Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S.** Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*. **2012**;164(2):192–204.
- Mironov AF.** Second-generation photosensitizers based on natural chlorines and bacteriochlorines. *CIS Selected Papers: Laser Use in Oncology*. International Society for Optics and Photonics; **1996**. p. 150–65.
- Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R.** Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. **2021**;20(2):101–24.
- Motegi S-I, Ishikawa O.** Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci*. **2017**;86(2):83–9.
- Nagaya T, Nakamura YA, Choyke PL, Kobayashi H.** Fluorescence-Guided Surgery. *Front Oncol*. **2017**;7:314.

- Ong SY, Zhang C, Dong X, Yao SQ.** Recent Advances in Polymeric Nanoparticles for Enhanced Fluorescence and Photoacoustic Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*. **2021**;60(33):17797–809.
- Osborne CK.** Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; **1998**;339(22):1609–18.
- Palekar-Shanbhag P, Jog SV, Chogale MM, Gaikwad SS.** Theranostics for cancer therapy. *Curr Drug Deliv*. **2013**;10(3):357–62.
- Pallares RM, Mottaghy FM, Schulz V, Kiessling F, Lammers T.** Nanoparticle Diagnostics and Theranostics in the Clinic. *J Nucl Med*. **2022**;63(12):1802–8.
- Panzarini E, Mariano S, Carata E, Mura F, Rossi M, Dini L.** Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2018**;19(5):1305.
- Pearce AK, O'Reilly RK.** Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjugate Chem*. American Chemical Society; **2019**;30(9):2300–11.
- Peralta DV, He J, Wheeler DA, Zhang JZ, Tarr MA.** Encapsulating gold nanomaterials into size-controlled human serum albumin nanoparticles for cancer therapy platforms. *J Microencapsul*. **2014**;31(8):824–31.
- Picard FJ, Bergeron MG.** Rapid molecular theranostics in infectious diseases. *Drug Discov Today*. **2002**;7(21):1092–101.
- Poderys V, Jarockyte G, Bagdonas S, Karabanovas V, Rotomskis R.** Protein-stabilized gold nanoclusters for PDT: ROS and singlet oxygen generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2020**;204:111802.
- Poderys V, Matulionytė-Safinė M, Rupšys D, Rotomskis R.** Protein stabilized Au nanoclusters: spectral properties and photostability. *Lithuanian Journal of Physics*. **2016**;56(1):55–65.
- Purich K, Dang JT, Poonja A, Sun WYL, Bigam D, Birch D ir kt.** Intraoperative fluorescence imaging with indocyanine green in hepatic resection for malignancy: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *Surg Endosc*. **2020**;34(7):2891–903.
- Qiu H, Tan M, Ohulchanskyy TY, Lovell JF, Chen G.** Recent Progress in Upconversion Photodynamic Therapy. *Nanomaterials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2018**;8(5):344.
- Qu ZG, He XC, Lin M, Sha BY, Shi XH, Lu TJ ir kt.** Advances in the understanding of nanomaterial-biomembrane interactions and their mathematical and numerical modeling. *Nanomedicine (Lond)*. **2013**;8(6):995–1011.

- Ramanathan S, Archunan G, Sivakumar M, Tamil Selvan S, Fred AL, Kumar S ir kt.** Theranostic applications of nanoparticles in neurodegenerative disorders. *Int J Nanomedicine*. **2018**;13:5561–76.
- Rawal M, Singh A, Amiji MM.** Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm Res*. **2019**;36(11):153.
- Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D ir kt.** Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; **2018**;118(1):17–23.
- Retnakumari A, Setua S, Menon D, Ravindran P, Muhammed H, Pradeep T ir kt.** Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology*. **2010**;21(5):055103.
- Rojas-Gutierrez PA, Bekah D, Seuntjens J, DeWolf C, Capobianco JA.** Cellular Uptake, Cytotoxicity and Trafficking of Supported Lipid-Bilayer-Coated Lanthanide Upconverting Nanoparticles in Alveolar Lung Cancer Cells. *ACS Appl. Bio Mater*. American Chemical Society; **2019**;2(10):4527–36.
- Rotomskis R, Streckytė G.** Fluorescencinė diagnostika biomedicinoje. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla; **2007**.
- Russell BA, Jachimska B, Kralka I, Mulheran PA, Chen Y.** Human serum albumin encapsulated gold nanoclusters: effects of cluster synthesis on natural protein characteristics. *J. Mater. Chem. B*. The Royal Society of Chemistry; **2016**;4(42):6876–82.
- Samani RK, Tavakoli MB, Maghsoudinia F, Motaghi H, Hejazi SH, Mehrgardi MA.** Trastuzumab and folic acid functionalized gold nanoclusters as a dual-targeted radiosensitizer for megavoltage radiation therapy of human breast cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2020**;153:105487.
- Samia ACS, Chen X, Burda C.** Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc*. American Chemical Society; **2003**;125(51):15736–7.
- Sandland J, Boyle RW.** Photosensitizer Antibody-Drug Conjugates: Past, Present, and Future. *Bioconjug Chem*. **2019**;30(4):975–93.
- Sarbadhikary P, George BP, Abrahamse H.** Recent Advances in Photosensitizers as Multifunctional Theranostic Agents for Imaging-Guided Photodynamic Therapy of Cancer. *Theranostics*. **2021**;11(18):9054–88.
- Sarkar S, Sengupta A, Hazra P, Mandal P.** Blue Emission in Proteins. **2014**;

- Seidlin SM, Marinelli LD, Oshry E.** Radioactive iodine therapy; effect on functioning metastases of adenocarcinoma of the thyroid. *J Am Med Assoc.* **1946**;132(14):838–47.
- Shan X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z.** Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **2022**;
- Sharma M, Dube T, Chibh S, Kour A, Mishra J, Panda JJ.** Nanotheranostics, a future remedy of neurological disorders. *Expert Opin Drug Deliv.* **2019**;16(2):113–28.
- Sharma R, Mody N, Agrawal U, Vyas SP.** Theranostic Nanomedicine; A Next Generation Platform for Cancer Diagnosis and Therapy. *Mini Rev Med Chem.* **2017**;17(18):1746–57.
- Syburra T, Schurr U, Rahn M, Graves K, Genoni M.** Gold-coated pacemaker implantation after allergic reactions to pacemaker compounds. *Europace.* **2010**;12(5):749–50.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB.** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* **2006**;119(Pt 11):2204–13.
- Sindhvani S, Syed AM, Ngai J, Kingston BR, Maiorino L, Rothschild J ir kt.** The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat Mater.* **2020**;19(5):566–75.
- Skripka A, Karabanovas V, Jarockyte G, Marin R, Tam V, Cerruti M ir kt.** Decoupling Theranostics with Rare Earth Doped Nanoparticles. *Advanced Functional Materials.* **2019**;29(12):1807105.
- Skripka A, Mendez-Gonzalez D, Marin R, Ximendes E, Rosal B del, Jaque D ir kt.** Near infrared bioimaging and biosensing with semiconductor and rare-earth nanoparticles: recent developments in multifunctional nanomaterials. *Nanoscale Adv.* RSC; **2021**;3(22):6310–29.
- Stenström W, Reinhard M.** ULTRA-VIOLET ABSORPTION SPECTRA OF BLOOD SERUM AND CERTAIN AMINO ACIDS. *Journal of Biological Chemistry.* **1925**;66(2):819–27.
- Stoscheck CM.** Quantitation of protein. Deutscher MP, sudarytojas. *Methods in Enzymology.* Academic Press; **1990.** p. 50–68.
- Su Y-L, Hu S-H.** Functional Nanoparticles for Tumor Penetration of Therapeutics. *Pharmaceutics.* **2018**;10(4):E193.
- Sumer B, Gao J.** Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (Lond).* **2008**;3(2):137–40.
- Suo Z, Hou X, Hu Z, Liu Y, Xing F, Feng L.** Fibrinogen-templated gold nanoclusters for fluorometric determination of cysteine and mercury(II). *Microchim Acta.* **2019**;186(12):799.

- Tang J, Lobatto ME, Read JC, Mieszawska AJ, Fayad ZA, Mulder WJM.** Nanomedical Theranostics in Cardiovascular Disease. *Curr Cardiovasc Imaging Rep.* **2012**;5(1):19–25.
- Tavakkoli Yaraki M, Liu B, Tan YN.** Emerging Strategies in Enhancing Singlet Oxygen Generation of Nano-Photosensitizers Toward Advanced Phototherapy. *Nano-Micro Lett.* **2022**;14(1):123.
- Tepale N, Fernández-Escamilla VVA, Carreon-Alvarez C, González-Coronel VJ, Luna-Flores A, Carreon-Alvarez A ir kt.** Nanoengineering of Gold Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization, and Applications. *Crystals.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2019**;9(12):612.
- Theodossiou TA, Ali M, Grigalavicius M, Grallert B, Dillard P, Schink KO ir kt.** Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy. *npj Breast Cancer.* Nature Publishing Group; **2019**;5(1):1–10.
- Tipirneni KE, Rosenthal EL, Moore LS, Haskins AD, Udayakumar N, Jani AH ir kt.** Fluorescence Imaging for Cancer Screening and Surveillance. *Mol Imaging Biol.* **2017**;19(5):645–55.
- Ungor D, Barbasz A, Czyżowska A, Csapó E, Oćwieja M.** Cytotoxicity studies of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters on human lymphocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2021**;200:111593.
- Valanciunaite J, Skripka A, Streckyte G, Rotomskis R.** Complex of water-soluble CdSe/ZnS quantum dots and chlorin e(6): interaction and FRET. Kinnunen M, Myllyla R, sudarytojai. *Laser Applications in Life Sciences.* Bellingham: Spie-Int Soc Optical Engineering; **2010**. p. UNSP 737607.
- Valle CA del, Hirsch T, Marín MJ.** Recent advances in near infrared upconverting nanomaterials for targeted photodynamic therapy of cancer. *Methods Appl. Fluoresc.* IOP Publishing; **2022**;10(3):034003.
- Van Cruchten S, Van den Broeck W.** Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia.* **2002**;31(4):214–23.
- Voronovic E, Skripka A, Jarockyte G, Ger M, Kuciauskas D, Kaupinis A ir kt.** Uptake of Upconverting Nanoparticles by Breast Cancer Cells: Surface Coating versus the Protein Corona. *ACS Appl Mater Interfaces.* **2021**;13(33):39076–87.
- Wang C, He M, Chen B, Hu B.** Study on cytotoxicity, cellular uptake and elimination of rare-earth-doped upconversion nanoparticles in human hepatocellular carcinoma cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2020**;203:110951.
- Wang C, Tao H, Cheng L, Liu Z.** Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials.* **2011**;32(26):6145–54.

- Wang J, Liu G, Leung KC-F, Loffroy R, Lu P-X, Wang YXJ.** Opportunities and Challenges of Fluorescent Carbon Dots in Translational Optical Imaging. *Curr Pharm Des.* **2015**;21(37):5401–16.
- Wang J, Wang F, Xu J, Wang Y, Liu Y, Chen X ir kt.** Lanthanide-doped LiYF₄ nanoparticles: Synthesis and multicolor upconversion tuning. *Comptes Rendus Chimie.* **2010**;13(6–7):731–6.
- Wang J, Zhang G, Li Q, Jiang H, Liu C, Amatore C ir kt.** In vivo self-bio-imaging of tumors through in situ biosynthesized fluorescent gold nanoclusters. *Scientific Reports.* Nature Publishing Group; **2013**;3(1):1157.
- Wang Z, Wang X, Wan J-B, Xu F, Zhao N, Chen M.** Optical Imaging in the Second Near Infrared Window for Vascular Bioimaging. *Small.* **2021**;17(43):2103780.
- Wani TU, Raza SN, Khan NA.** Nanoparticle opsonization: forces involved and protection by long chain polymers. *Polym. Bull.* **2020**;77(7):3865–89.
- Wei H, Wang Z, Yang L, Tian S, Hou C, Lu Y.** Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster: Synthesis and application as Hg²⁺ sensor. *Analyst.* The Royal Society of Chemistry; **2010**;135(6):1406–10.
- Wysokińska E, Cichos J, Kowalczyk A, Karbowski M, Strządala L, Bednarkiewicz A ir kt.** Toxicity Mechanism of Low Doses of NaGdF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Upconverting Nanoparticles in Activated Macrophage Cell Lines. *Biomolecules.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; **2019**;9(1):14.
- Wysokińska E, Cichos J, Ziolo E, Bednarkiewicz A, Strządala L, Karbowski M ir kt.** Cytotoxic interactions of bare and coated NaGdF₄:Yb³⁺:Er³⁺ nanoparticles with macrophage and fibroblast cells. *Toxicology in Vitro.* **2016**;32:16–25.
- With TK.** Porphyrins in erythrocytes and blood plasma: preliminary studies with qualitative thin-layer chromatography. *Clin Sci Mol Med.* **1977**;52(5):463–7.
- Xavier PL, Chaudhari K, Verma PK, Pal SK, Pradeep T.** Luminescent quantum clusters of gold in transferrin family protein, lactoferrin exhibiting FRET. *Nanoscale.* The Royal Society of Chemistry; **2010**;2(12):2769–76.
- Xiao L, Gu L, Howell SB, Sailor MJ.** Porous Silicon Nanoparticle Photosensitizers for Singlet Oxygen and Their Phototoxicity against Cancer Cells. *ACS Nano.* American Chemical Society; **2011**;5(5):3651–9.
- Xie J, Zheng Y, Ying JY.** Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *J Am Chem Soc.* **2009**;131(3):888–9.
- Xu C, Wang Y, Zhang C, Jia Y, Luo Y, Gao X.** AuGd integrated nanoprobe for optical/MRI/CT triple-modal in vivo tumor imaging. *Nanoscale.* The Royal Society of Chemistry; **2017**;9(13):4620–8.

- Zhan Q, Wang B, Wen X, He S.** Controlling the excitation of upconverting luminescence for biomedical theranostics: neodymium sensitizing. *Opt. Mater. Express, OME*. Optica Publishing Group; **2016**;6(4):1011–23.
- Zhang A, Tu Y, Qin S, Li Y, Zhou J, Chen N ir kt.** Gold nanoclusters as contrast agents for fluorescent and X-ray dual-modality imaging. *J Colloid Interface Sci.* **2012**;372(1):239–44.
- Zhang B, Chen J, Cao Y, Chai OJH, Xie J.** Ligand Design in Ligand-Protected Gold Nanoclusters. *Small.* **2021a**;17(27):2004381.
- Zhang C, Gao X, Chen W, He M, Yu Y, Gao G ir kt.** Advances of gold nanoclusters for bioimaging. *iScience.* **2022**;25(10):105022.
- Zhang H, Shan Y, Dong L.** A comparison of TiO₂ and ZnO nanoparticles as photosensitizers in photodynamic therapy for cancer. *J Biomed Nanotechnol.* **2014**;10(8):1450–7.
- Zhang Y, Lovell JF.** Porphyrins as Theranostic Agents from Prehistoric to Modern Times. *Theranostics.* **2012**;2(9):905–15.
- Zhang S, Fu Q, Zhang Y, Pan J, Zhang L, Zhang Z ir kt.** Surface loading of nanoparticles on engineered or natural erythrocytes for prolonged circulation time: strategies and applications. *Acta Pharmacol Sin.* **2021b**;42(7):1040–54.
- Zhang Z, Yao Y, Yuan Q, Lu C, Zhang X, Yuan J ir kt.** Gold clusters prevent breast cancer bone metastasis by suppressing tumor-induced osteoclastogenesis. *Theranostics.* **2020**;10(9):4042–55.
- Zhao J, Hu H, Liu W, Wang X.** Multifunctional NaYF₄:Nd/NaDyF₄ nanocrystals as a multimodal platform for NIR-II fluorescence and magnetic resonance imaging. *Nanoscale Adv. RSC*; **2021**;3(2):463–70.
- Zheng B, Wu Q, Jiang Y, Hou M, Zhang P, Liu M ir kt.** One-pot synthesis of ⁶⁸Ga-doped ultrasmall gold nanoclusters for PET/CT imaging of tumors. *Materials Science and Engineering: C.* **2021**;128:112291.
- Zheng Y, Yang H, Wang H, Kang K, Zhang W, Ma G ir kt.** Fluorescence-guided surgery in cancer treatment: current status and future perspectives. *Ann Transl Med.* **2019**;7(Suppl 1):S6.
- Zhou F, Feng B, Yu H, Wang D, Wang T, Liu J ir kt.** Cisplatin Prodrug-Conjugated Gold Nanocluster for Fluorescence Imaging and Targeted Therapy of the Breast Cancer. *Theranostics.* Ivyspring International Publisher; **2016**;6(5):679–87.

9. PADEKA

Pirmiausiai norėčiau padėkoti doktorantūros vadovui prof. Ričardui Rotomskiui už suteiktą galimybę mokytis ir dirbti Nacionalinio vėžio instituto Biomedicininės fizikos laboratorijoje. Ačiū Jums už mokslines diskusijas, palaikymą ir kritiką, tikėjimą ir pasitikėjimą manimi bei nuolatinį skatinimą judėti pirmyn.

Taip pat noriu padėkoti visam Biomedicininės fizikos laboratorijos kolektyvui už nuoširdų palaikymą ir pagalbą įvairiose kasdieninėse situacijose. Ypač dėkoju prof. Vitalijui Karabanovui už pagalbą planuojant eksperimentus, sprendžiant kilusias problemas bei mokslines diskusijas aptarinėjant gautus rezultatus ir rašant mokslines publikacijas. Dėkoju Viliui Poderiui ir Alėjai Marijai Daugėlaitei už nepamainomą pagalbą eksperimentų metu, Marijui Plečkaičiui už pagalbą redaguojant disertacijos tekstą.

Taip pat esu labai dėkinga dr. Artiom Skripka už bendradarbiavimą ir konsultacijas.

Ačiū šios disertacijos recenzentėms prof. Almirai Ramanavičienei ir dr. Agatai Mlynskai už skirtą laiką ir vertingas pastabas.

Labiausiai noriu padėkoti savo artimiausiems žmonėms. Dėkoju mamai Violetai ir tėčiui Rimantui už palaikymą ir supratimą ilgais studijų metais. Ačiū Justinui už paramą ir kantrybę disertacijos rašymo laikotarpiu.

Esu dėkinga visiems, kurie buvo šalia ir palaikė mane doktorantūros studijų metu bei padėjo augti kaip mokslininkei.

10. TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ

GRETA JAROCKYTĖ

DABARTINĖ VEIKLA

nuo 2018 m. Nacionalinis vėžio institutas
Biomedicininės fizikos laboratorija
Jaunesnioji mokslo darbuotoja

IŠSILAVINIMAS

2018-2022 m. Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biofizikos doktorantūra

2016-2018 m. Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biofizikos magistras

2012-2016 m. Vilniaus universitetas
Gamtos mokslų fakultetas
Biofizikos bakalauras

MOKSLINIO DARBO PATIRTIS

2018-2023 m. VMTI Inovatyvios medicinos centras
ES struktūrinių fondų finansuojamas projektas
„Nanobiosensoriaus kūrimas: diagnostinių
biožymenų multipleksinė analizė osteoartrito
terapijai personalizuoti“
Dotacijos nr. 01.2.2-LMT-K-718-02-0022
Jaunesnioji mokslo darbuotoja

2019-2022 m. Vilniaus universitetas
ES struktūrinių fondų finansuojamas projektas
„Poliarimetrinė netiesinė mikroskopija
biomedicininiais tyrimams ir vėžio diagnostikai“.
Dotacijos nr. 01.2.2-LMT-K-718-02-0016.
Jaunesnioji mokslo darbuotoja

- 2015-2018 m. Nacionalinis vėžio institutas
Biomedicininės fizikos laboratorija
Biofizikė
- 2014-2017 m. Nacionalinis vėžio institutas
Biomedicininės fizikos laboratorija
Inžinierė
- 2014-2017 m. Nacionalinis vėžio institutas
Lietuvos-Latvijos-Taivano trišalės kooperacijos
programos projektas „Mezenchiminių kamieninių ir
vėžinių kamieninių ląstelių atsakas į nanodalelių
poveikį“, dotacijos Nr. TAP-LLT-13-016.
Specialistė
- 2016 m. Nacionalinis vėžio institutas
Lietuvos mokslo tarybos finansuotas Mokslininkų
grupių projektas „Tikslingai legiruotų Na(Gd/Y)F₄
nanodalelių optinių savybių ir biosuderinamumo
tyrimai”.
Specialistė.
- 2014 m. Nacionalinis vėžio institutas
Lietuvos mokslo tarybos finansuotas „Studentų
mokslinės veiklos skatinimo“ projektas.

PEDAGOGINĖ VEIKLA

- nuo 2018 m. Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biofotonikos laboratoriniai darbai
- nuo 2020 m. Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Lazeriai biologijoje ir medicinoje
paskaitos ir seminarai

APDOVANOJIMAI, STIPENDIJOS, PREMIJOS

- 2022 m. L'Oréal-UNESCO jaunųjų talentų programos
Baltijos šalyse „Moterims moksle“ apdovanojimas.

- 2020 ir 2022 m. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro vardinė stipendija už puikius mokslo rezultatus, aktyvią mokslinę, mokslo populiarinimo ir organizacinę veiklą.
- 2019 ir 2020 m. Lietuvos mokslo tarybos doktorantams skirta parama už akademinis pasiekimus.
- 2018 m. Antros vietos diplomą už stendinį pranešimą tarptautinėje konferencijoje „Baltic Biophysics Conference“.
- 2018 m. Lietuvos jaunųjų mokslininkų sąjungos paskelbtame konkurse magistro baigiamasis darbas „Retaisiais žemės metalais legiruotų nanodalelių pritaikymas diagnostikoje ir fotosensibilizuotoje navikų terapijoje“ buvo apdovanotas kaip geriausias biomedicinos mokslų srities magistro darbas.
- 2017 m. Lietuvos mokslų akademijos premija aukštųjų mokyklų studentų mokslinių darbų konkurso nugalėtojams už mokslinį darbą „Nanodarinių, naudojamų navikinių susirgimų diagnostikai ir terapijai, tyrimai 3D sferoidinių ląstelių kultūrų modelyje“.
- 2015-2016 m. m. Vardinė Prezidento Kazio Griniaus (biomedicinos mokslų studijų sritis) stipendija.
- 2015 m. Pirmos vietos diplomą už stendinį pranešimą tarptautinėje konferencijoje „Current Trends in Cancer Theranostics“.

SERTIFIKATAI

- 2019 m. „Laboratorinių (bandomųjų) gyvūnų mokslo“ kurso pažymėjimas, suteikiantis teisę savarankiškai planuoti ir atlikti eksperimentus su bandomaisiais gyvūnais pagal 2010/63/ES Europos Parlamento ir Tarybos Direktyvos 23 straipsnį.

11. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Publikacijų sąrašas disertacijos tema:

1. **Jarockyte G.**, Poderys V., Barzda V., Karabanovas V., Rotomskis R. Blood Plasma Stabilized Gold Nanoclusters for Personalized Tumor Theranostics. *Cancers*, 2022, 14(8), 1887 (IF: 6,575, Q1). <https://doi.org/10.3390/cancers14081887>
2. **Jarockyte G.**, Karabanovas V., Rotomskis R., Mobasheri A. Multiplexed Nanobiosensors: Current Trends in Early Diagnostics. *Sensors*, 2020, 20, 6890 (IF: 3,847, Q2). <https://doi.org/10.3390/s20236890>
3. Poderys V., **Jarockyte G.**, Bagdonas S., Karabanovas V., Rotomskis R. Protein-stabilized gold nanoclusters for PDT: ROS and singlet oxygen generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2020, 204 (IF: 6,814, Q1). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111802>
4. Skripka A., Karabanovas V., **Jarockyte G.**, Marin R., Tam V., Cerruti M., Rotomskis R., Vetrone F. Decoupling Theranostics with Rare Earth Doped Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29 (1), 1-12 (IF: 19,924, Q1). <https://doi.org/10.1002/adfm.201807105>

Publikacijos ne disertacijos tema:

5. **Jarockyte G.**, Stasys M., Poderys V., Buivydaite K., Pleckaitis M., Bulotiene D., Matulionyte M., Karabanovas V., Rotomskis R. Biodistribution of Multimodal Gold Nanoclusters Designed for Photoluminescence-SPECT/CT Imaging and Diagnostic. *Nanomaterials*, 2022, 12(19), 259 (IF: 5,719, Q1, Q2). <https://doi.org/10.3390/nano12193259>
6. Jurgutis D., **Jarockyte G.**, Poderys V., Dodonova-Vaitkuniene J., Tumkevicius S., Vysniauskas A., Rotomskis R., Karabanovas V. Exploring BODIPY-Based Sensor for Imaging of Intracellular Microviscosity in Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10), 5687 (IF: 6,208, Q1, Q2). <https://doi.org/10.3390/ijms23105687>
7. Pleckaitis M., Habach F., Kontenis I., Steinbach G., **Jarockyte G.**, Kalnaityte A., Domonkos I., Akhtar P., Alizadeh M., Bagdonas S., Karabanovas V., Garab G., Rotomskis R., Barzda V. Structure and principles of self-assembly of giant “sea urchin” type sulfonatophenyl porphine aggregates. *Nano Research*, 2022 (IF: 10,269, Q1). <https://doi.org/10.1007/s12274-021-4048-x>

8. Klimkevicius V., Voronovic E., **Jarockyte G.**, Skripka A., Vetrone F., Katelnikovas A., Karabanovas V. Polymer Brush Coated Upconverting Nanoparticles with Improved Colloidal Stability and Cellular Labeling. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022 (IF: 7,571, Q1). <https://doi.org/10.1039/D1TB01644J>
9. Voronovic E., Skripka A., **Jarockyte G.**, Ger M, Kuciauskas D., Kaupinis A., Valius M., Rotomskis R., Vetrone F., Karabanovas V. Uptake of Upconverting Nanoparticles by Breast Cancer Cells: Surface Coating versus the Protein Corona. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021 (IF: 10,383, Q1). <https://doi.org/10.1021/acsami.1c10618>
10. Astrauskas R., Ivanauskas F., **Jarockytė G.**, Karabanovas V., Rotomskis R. Modeling the uptake of fluorescent molecules into 3D cellular spheroids. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 2019, 24, 1-15 (IF: 2,217, Q1, Q2, Q3). <https://doi.org/10.15388/NA.2019.5.9>
11. **Jarockyte G.**, Dapkute D., Karabanovas V., Daugmaudis J. V., Ivanauskas F., Rotomskis R. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2018, 1862, 4, 914-923 (IF: 4,117, Q2, Q3). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.12.014>
12. Baziulyte-Paulaviciene D., Karabanovas V., Stasys M., **Jarockyte G.**, Poderys V., Sakirzanovas S., Rotomskis R. Synthesis and functionalization of NaGdF₄:Yb, Er@NaGdF₄ core-shell nanoparticles for possible application as multimodal contrast agents. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2017, 8, 1815-1824 (IF: 3.272, Q2, Q3). <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.183>
13. Matulionyte M., Dapkute D., Budenaite L., **Jarockyte G.**, Rotomskis R. Photoluminescent Gold Nanoclusters in Cancer Cells: Cellular Uptake, Toxicity, and Generation of Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(2), 378 5687 (IF: 6,208, Q1, Q2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020378>
14. **Jarockyte G.**, Daugelaite E., Stasys M., Statkute U., Poderys V., Tseng T-C., Hsu Sh-H., Karabanovas V., Rotomskis R. Accumulation and Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Cells and Experimental Animals, *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8), 1193 5687 (IF: 6,208, Q1, Q2). <https://doi.org/10.3390/ijms17081193>

12. REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Doktorantūros metu vykdyti tyrimai buvo pristatomi įvairiose mokslinėse konferencijose. Žemiau pateikiamas konferencijų pranešimų sąrašas. Pranešėjas pabrauktas. Disertacijos autorė doktorantūros laikotarpiu pati pristatė 6 pranešimus konferencijose (3 žodinius ir 3 standinius), dar 7 pranešimai doktorantūros meta buvo pristatyti kitų bendraautorių.

Žodiniai pranešimai disertacijos tema:

1. Skripka A., Karabanovas V., **Jarockyte G.**, Marin R., Tam V., Cerruti M., Rotomskis R., Vetrone F. Decoupling theranostics with rare earth doped nanoparticles: wavelength specific functional response. *1st Workshop on Luminescence & Magnetism in Molecules & Materials*. 2019 m. kovo 11 d., Otava, Kanada.
2. Skripka A., Karabanovas V., **Jarockyte G.**, Marin R., Tam V., Cerruti M., Rotomskis R., Vetrone F. Decoupled theranostics with rare earth doped nanoparticles. Tarptautinė konferencija *Current Trends in Cancer Theranostics*. 2019 m. birželio 30 d. – liepos 4 d. Trakai, Lietuva.
3. **Jarockytė G.**, Poderys V., Rupšys D., Bagdonas S., Karabanovas V., Rotomskis R. Fotosensibilizuota navikų terapija naudojant aukso nanoklasterius. *43-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija*. 2019 m. spalio 3-5 d., Kaunas, Lietuva.
4. Karabanovas V., Skripka A., **Jarockytė G.**, Dapkutė D., Vetrone F., Rotomskis R. Daugiafunkcės nanomedžiagos navikų teranostikai. *43-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija*. 2019 m. spalio 3-5 d., Kaunas, Lietuva.
5. **Jarockytė G.**, Karabanovas V., Rotomskis R. Teranostinių nanodalelių pritaikymo galimybių onkologinių ligų diagnostikoje ir terapijoje tyrimas. Nacionalinė konferencija *BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos*. 2020 gruodžio 4 d.
6. Daugėlaitė A.M., **Jarockytė G.**, Skripka A., Poderys V., Karabanovas V., Vetrone F., Rotomskis R. Human dermal mesenchymal stem cells as nanoparticles vehicles. Tarptautinė konferencija *Open Readings*. 2022 m. kovo 15-18 d. Nuotolinė konferencija.
7. **Jarockytė G.**, Poderys V., Karabanovas V., Rotomskis R. Aukso nanoklasteriai personalizuotai navikų teranostikai. Nacionalinė konferencija *BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos*. 2022 m. lapkričio 24 d., Vilnius, Lietuva.

Stendiniai pranešimai disertacijos tema:

8. **Jarockytė G.**, Skripka A., Karabanovas V., Marin R., Tam V., Cerruti M., Vetrone F., Rotomskis R. Two-wavelength excited multilayer lanthanides-doped nanoparticles for cancer theranostics. Tarptautinė konferencija *Baltic Biophysics Conference*. 2018 m. spalio 4-5 d., Kaunas, Lietuva. **Pranešimas apdovanotas II vietos geriausio stendinio pranešimo sertifikatu.**
9. **Jarockyte G.**, Poderys V., Rupsys D., Bagdonas S., Karabanovas V., Rotomskis R. Protein-stabilized gold nanoclusters for cancer theranostics. Tarptautinė konferencija *Current Trends in Cancer Theranostics*. 2019 m. birželio 30 d. – liepos 4 d., Trakai, Lietuva.
10. **Jarockytė G.**, Poderys V., Karabanovas V., Rotomskis R. Kraujo plazmos baltymais stabilizuoti aukso nanoklasteriai personalizuotai navikų teranostikai. *44-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija*. 2021 m. spalio 6-8 d., Vilnius.
11. Daugėlaitė A.M., **Jarockytė G.**, Skripka A., Poderys V., Karabanovas V., Vetrone F., Rotomskis R. Aukštyneičių nanodalelių ir mezenchiminių kamieninių ląstelių sinergija: tikslinės navikų teranostikos link. *44-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija*. 2021 m. spalio 6-8 d., Vilnius.
12. Daugėlaitė A.M., **Jarockytė G.**, Skripka A., Poderys V., Karabanovas V., Vetrone F., Rotomskis R. Potential use of human dermal mesenchymal stem cells and multilayer nanoparticles for cancer theranostics. Tarptautinė student konferencija *The COINS*. 2022 m. vasario 28 d. – kovo 3 d. Nuotolinė konferencija.
13. Daugėlaitė A.M., **Jarockytė G.**, Skripka A., Poderys V., Vetrone F., Rotomskis R., Karabanovas V. Mesenchymal Stem Cells and Rare Earth Nanoparticles – a Potent Combination for Photodynamic Therapy of Cancer. Tarptautinė konferencija *3rd Baltic Biophysics Conference*. 2022 m. spalio 6-7 d., Vilnius, Lietuva.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 20 egz.